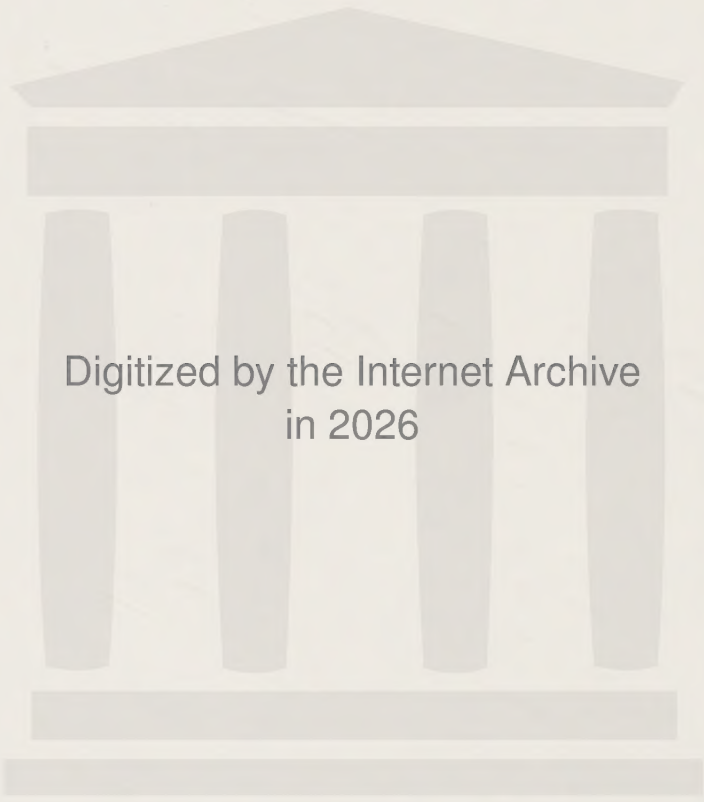


**Isolierung
und Charakterisierung zellulärer
Transkriptionskontrollsequenzen
aus dem Genom einer Hamsterzelllinie**

Sabine Garbrecht-Büttner

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmacie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Isolierung und Charakterisierung zellulärer Transkriptionskontrollsequenzen
aus dem Genom einer Hamsterzelllinie**

von

Sabine Garbrecht-Büttner

aus

Dresden

1988

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 2 (3) der Promotionsordnung vom 5.3.1981 von Prof. Dr. Fanning betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.
München, am 11. 10. 1988

Selive Gotsch-Baiten

Dissertation eingereicht am 11. 10. 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Fanning
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 11. 1988

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1985 bis Juni 1988 unter Leitung von Frau Prof.Dr. Ellen Fanning am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München ausgeführt.

Frau Prof.Dr. Ellen Fanning danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes sowie für die Unterstützung während dieser Arbeit.

Frau Dr. Inge Kruczek möchte ich herzlich danken für die Betreuung dieser Arbeit, ihre Anregungen und ihre freundschaftliche Unterstützung.

Mein Dank gilt weiterhin Frl. Sabine Domrath für die Hilfe bei der Durchführung von Experimenten und die Anfertigung der Photographien.

Abschließend danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie das angenehme Arbeitsklima.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite:
1. Einleitung	1
2. Materialien	
2.1. Zelllinien, Bakterien, Phagen und Plasmide	9
2.2. Enzyme	10
2.3. Chemikalien und andere Materialien	10
2.4. Puffer, Medien und Lösungen	12
3. Methoden	
3.1. Zellkultur	
3.1.1. Zellkultivierung	13
3.1.2. Aufbewahren von Zelllinien	13
3.2. Bakterienkultur	
3.2.1. Vermehrung von Bakterien	13
3.2.2. Aufbewahren von Bakterienstämmen	13
3.3. Phagen	
3.3.1. Präparation von Bakterien zur Transformation	14
3.3.2. Titerbestimmung und Präparation von Stocklösungen	14
3.4. Präparation und Analyse von DNA	
3.4.1. Präparation von chromosomaler DNA aus tierischen Zellen	15
3.4.2. Präparation niedermolekularer DNA aus tierischen Zellen	15
3.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA über Dichtegradienten- zentrifugation	16
3.4.4. Schnellmethode zur Isolierung von Plasmid-DNA	16
3.4.5. Isolierung von λ -Phagen-DNA	17
3.4.6. Phagenschnellaufschlüsse	18
3.4.7. Auftrennung von DNA auf Agarosegelen	19
3.5. Präparation und Analyse von RNA	
3.5.1. Isolierung von RNA aus tierischen Zellen	20
3.5.2. Auftrennung von RNA auf Glyoxalgelen	20
3.5.3. Auftrennung von RNA auf Formaldehydgelen	21
3.6. Enzymatische Manipulationen an DNA	
3.6.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	21
3.6.2. Phosphatasebehandlung	22
3.6.3. <i>In vitro</i> -Markierung von DNA mit α - ³² P-dCTP (Nicktranslation)	22

	Seite:
3.6.4. Markierung von DNA durch "Oligoprimering"	23
3.6.5. 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden	23
3.6.6. Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	24
3.7. Charakterisierung von RNA und DNA	
3.7.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	24
3.7.2. Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter	25
3.7.3. Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter	25
3.7.4. Hybridisierung mit <i>in vitro</i> -markierten Proben	26
3.8. Klonieren in Plasmide	
3.8.1. Vorbehandlung des Vektors	27
3.8.2. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	27
3.8.3. Transformation von Bakterien	27
3.9. Zellfusion	28
3.10. Transiente Expression des CAT-Gens	
3.10.1. Transfektion von Zellen nach der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode	28
3.10.2. Präparation von Proteinextrakten	29
3.10.3. Proteinbestimmung	29
3.10.4. CAT-Aktivitätstest	30
3.11. Konstruktion einer genomischen DNA-Bank in λ -Phagen	
3.11.1. Präparation von λ -Vektorarmen	30
3.11.2. Präparation zellulärer DNA-Fragmente eines bestimmten Größenbereiches	31
3.11.3. Herstellung von Verpackungsextrakten für λ -Phagen-DNA	31
3.11.4. <i>In vitro</i> -Verpackung von Phagen-DNA	33
3.11.5. Verknüpfung von λ -Armen mit zellulären DNA-Fragmenten	33
3.11.6. Amplifikation von Genbanken	33
3.11.7. Plaquehybridisierung	34
3.11.8. Plaquereinigung von Phagen	34
3.12. Sequenzierung doppelsträngiger DNA	
3.12.1. Isolierung der Plasmid-DNA für Sequenzreaktionen	35
3.12.2. Sequenzreaktion	35
3.12.3. Elektrophorese von Sequenzgelen	36

	Seite:
4. Ergebnisse	
4.1. Promotorbereiche von pSV0, pSV2 und pdSV8	38
4.2. Klonierung des Promotorbereichs von pdSV8 vor das CAT-Gen	40
4.3. CAT-Aktivitätstest von pSV0CAT, pSV2CAT und pdSV8CAT	42
4.4. Klonierung des Promotors von pdSV8 vor das neo-Gen	45
4.5. Transfektion von BHK-Zellen mit pSV0neo, pSV2neo und pdSV8neo (1. Transfektionsrunde)	45
4.5.1. Southern Blot Analyse resistenter Zellklone aus der 1. Transfektionsrunde	48
4.5.2. Northern Blot Analyse resistenter Zellklone aus der 1. Transfektionsrunde	50
4.6. Transfektion von BHK-Zellen mit DNA-Fragmenten resistenter Zellklone (2. Transfektionsrunde)	52
4.6.1. Southern Blot Analyse resistenter Zellklone aus der 2. Transfektionsrunde	53
4.6.2. Northern Blot Analyse resistenter Zellklone aus der 2. Transfektionsrunde	55
4.7. Amplifikation von Einzelkopiesequenzen durch Fusion	57
4.8. Klonierungsstrategien	60
4.9. Restriktionsanalyse amplifizierter DNA	60
4.10. Klonierung amplifizierter zellulärer Integrationssequenzen in pUC 12	63
4.11. Restriktionsanalyse der klonierten zellulären Sequenzen	64
4.12. Klonierung der zellulären Sequenzen vor das CAT-Gen	72
4.13. CAT-Aktivitätstests von pdSV8 mit den zellulären Sequenzen	72
4.14. Test auf Enhancereigenschaften von HTC ₁ und HTC ₂	75
4.14.1. Klonierung von HTC ₁ und HTC ₂ an das 3'-Ende des CAT-Gens	75
4.14.2. CAT-Aktivitätstests der 3'-Klone von HTC ₁ und HTC ₂	79
4.14.3. Transfektion von HTC ₁ und HTC ₂ in verschiedene Zelllinien und Test der Promotoraktivität	84
4.15. Genomische Analyse von HTC ₁ und HTC ₂	91
4.16. Sequenzierung von HTC ₁ und HTC ₂	94
4.17. Sequenzvergleichsanalysen	98
4.18. Genbank der BHK-Zelllinie	102
4.19. Durchmustern der BHK-Genbank mit HTC ₁	103
5. Diskussion	114
6. Zusammenfassung	126
7. Anhang	127
8. Literaturverzeichnis	131

Verzeichnis der Abbildungen:

Seite:

Abb. 1a:	Strukturelemente eines eukaryotischen Polymerase II-Promotors	3
Abb. 1b:	Selektionsschema	8
Abb. 2a:	Strukturelemente des frühen Promotors von SV40 wt	39
Abb. 2b:	Strukturelemente des defekten Promotors von pdSV8	39
Abb. 3a:	Schematische Darstellung von pSV2CAT	40
Abb. 3b:	Schematische Darstellung von pSV0CAT	41
Abb. 3c:	Nru I/Hind III-Fragment von pdSV8	41
Abb. 4a:	CAT-Aktivitätstest von pSV0CAT, pSV2CAT und pdSV8CAT	43
Abb. 4b:	Graphische Darstellung der Ergebnisse des CAT-Tests aus Abb. 4a	44
Abb. 5:	Transfektionsschema	47
Abb. 6:	Southern Blot resistenter Zellklone der 1.Transfektionsrunde	49
Abb. 7:	Northern Blot resistenter Zellklone der 1.Transfektionsrunde	51
Abb. 8:	Southern Blot resistenter Zellklone der 2.Transfektionsrunde	54
Abb. 9:	Northern Blot resistenter Zellklone der 2.Transfektionsrunde	56
Abb. 10:	Southern Blot fusionierter Zellklone	58
Abb. 11:	Restriktionsanalyse niedermolekularer DNA fusionierter Zellklone	61
Abb. 12:	Integrations- und Hybridisierungsschema	63
Abb. 13:	Nachweis des defekten Promotorfragments in pUC 12/1 und pUC 12/2 (Agarosegel)	65
Abb. 14a:	Nachweis des defekten Promotorfragments in pUC 12/1 und pUC 12/2 (Autoradiographie)	66
Abb. 14b:	Schematische Darstellung des defekten Promotorfragments	66
Abb. 14c:	Schematische Darstellung des Hind III/Sal I-Restriktionsverdaus	67
Abb. 15a:	Restriktionsanalyse von pUC 12/1 und pUC 12/2 (Bgl I)	68
Abb. 15b:	Schematische Darstellung der Abb. 15a	69
Abb. 16a:	Restriktionsanalyse von pUC 12/1	70
Abb. 16b:	Schematische Darstellung der Abb. 16a	70
Abb. 17:	Restriktionskarte von pUC 12/1	71
Abb. 18:	Restriktionskarte von pUC 12/2	71
Abb. 19a:	CAT- Aktivitätstest von pSV2CAT, pdSV8CAT, pUC 12/1 CAT und pUC 12/2 CAT	73
Abb. 19b:	Graphische Darstellung der Ergebnisse des CAT-Tests aus Abb. 19a	74
Abb. 20:	Schematische Darstellung des Plasmids pSPT 18	75
Abb. 21:	Klonierungsstrategie der 3'-Klone von HTC ₁	76
Abb. 22:	Klonierungsstrategie der 3'-Klone von HTC ₂	78
Abb. 23:	Struktur der 3'-Klone von HTC ₁ und HTC ₂	79
Abb. 24a:	CAT-Aktivitätstests der 3'-Klone von HTC ₁	80
Abb. 24b:	Graphische Darstellung der Ergebnisse des CAT-Tests aus Abb. 24a	81

	Seite:
Abb. 25a: CAT-Aktivitätstests der 3'-Klone von HTC ₂	82
Abb. 25b: Graphische Darstellung der Ergebnisse des CAT-Tests aus Abb. 25a	83
Abb. 26a: CAT-Aktivitätstests von HTC ₁ und HTC ₂ in HeLa-Zellen	85
Abb. 26b: Graphische Darstellung der Ergebnisse des CAT-Tests aus Abb. 26a	86
Abb. 27a: CAT-Aktivitätstests von HTC ₁ und HTC ₂ in TC7-Zellen	87
Abb. 27b: Graphische Darstellung der Ergebnisse des CAT-Tests aus Abb. 27a	88
Abb. 28a: CAT-Aktivitätstests von HTC ₁ und HTC ₂ in L-Zellen	89
Abb. 28b: Graphische Darstellung der Ergebnisse des CAT-Tests aus Abb. 28a	90
Abb. 29a: Genomische Analyse von HTC ₁	92
Abb. 29b: Genomische Analyse von HTC ₂	93
Abb. 30: Subklone und Sequenzierungsstrategie von HTC ₁	94
Abb. 31: Subklone und Sequenzierungsstrategie von HTC ₂	95
Abb. 32: Sequenz von HTC ₁	96
Abb. 33a: Sequenz von HTC ₂	97
Abb. 33b: Schematische Darstellung des Plasmidanteils angrenzend an HTC ₂	98
Abb. 34: Schematische Darstellung des λ-Phagen EMBL 3A ⁺	103
Abb. 35a: Spaltmuster des Klon λ1	104
Abb. 35b: Schematische Darstellung der Insertfragmente von λ1 nach Sal I-Verdau	105
Abb. 35c: Schematische Darstellung der Insertfragmente von λ1 nach Hind III-Verdau	106
Abb. 36a: Spaltmuster des Klon λ1	107
Abb. 36b: Schematische Darstellung der Insertfragmente von λ1 nach Hind III/Eco RI-Verdau	108
Abb. 36c: Schematische Darstellung der Insertfragmente von λ1 nach Hind III/Sal I-Verdau	109
Abb. 37: Restriktionskarte von λ1	109
Abb. 38: Autoradiographie des Gels aus Abb. 36a (Lage von HTC ₁)	111
Abb. 39: Schematische Darstellung der Pst I-Schnittstellen in λ1	112
Abb. 40: Modell der Integration von neo-Resistenzplasmiden in die genomische DNA	115
Abb. 41: Amplifikationsmodell	118



Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Amp	Ampicillin
AP	"activating protein"
bp	Basenpaar
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CAM	Chloramphenicol
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
cts	gezählte Zerfälle
DME	Dulbecco's modified Eagles Medium
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
ddNTP	2'-3'-didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EtOH	Ethanol
G	Guanin
G418	Geneticin
g/l	Gramm pro Liter
h	Stunde
HTC	"hamster transcription control"
kb	Kilobasenpaare
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung
PEG	Polyethylenglycol
pfu	Plaque-bildende Einheit
(m)(r)RNA	(messenger)(ribosomale) Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Svedbergkonstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SP6	Salmonella Phage 6

T7	Phage T7
T	Thymin
T-Antigen	großes Tumorantigen
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Enzymeinheit (units)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
wt	Wildtyp

1. EINLEITUNG

Die molekularen Grundlagen der Genkontrolle in eukaryotischen Zellen sind ein komplexes und intensiv bearbeitetes Gebiet moderner Biologie. Die Frage nach dem Zusammenwirken einzelner Gene in einem kontrollierten Entwicklungsprozeß, der letztendlich zu einem funktionsfähigen Organismus führt, ist nach wie vor unbeantwortet. Trotzdem sind die Kenntnisse über die Kontrolle der Genexpression - nicht nur bei Prokaryonten und einzelligen Eukaryonten, sondern auch in tierischen Zellen - stark angewachsen. Der geordnete Ablauf von Ereignissen, den man als Genkontrolle bezeichnet, resultiert in unterschiedlichen Syntheseraten einzelner Proteine in verschiedenen Zellen. Diese differentielle Expression von Proteinen wird auf verschiedenen Ebenen reguliert (Darnell, 1982).

Mit Abstand am häufigsten wird auf der Basis der Transkriptionskontrolle, das heißt der unterschiedlichen Transkriptionsrate einer mRNA, reguliert. Weiterhin gibt es die Möglichkeiten der unterschiedlichen Prozessierung und Stabilität von mRNA, sowie der differentiellen Translation oder auch der Regulation über Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente. Bei Prokaryonten dient die differentielle Genexpression hauptsächlich dazu, die enzymatische Maschinerie der Zelle den äußerlich gegebenen Bedingungen anzupassen, um Wachstum und Zellteilung sicherzustellen. Ähnliche Verhältnisse liegen bei niederen Eukaryonten, wie zum Beispiel der Hefe, vor.

Bei vielzelligen Organismen jedoch liegt die Hauptaufgabe der Genkontrolle darin, einen kontrollierten Entwicklungsprozeß zu durchlaufen, bei dem das richtige Gen in der richtigen Zelle zum richtigen Zeitpunkt aktiviert wird. Nur so kann sich ein mehrzelliger Organismus entwickeln und anschließend eine spezialisierte Zelle ihre Aufgabe erfüllen. Dabei spielt sowohl das zielgerichtete Anschalten spezifischer Gene wie auch die parallel laufende Unterdrückung der Expression anderer Gene eine Rolle. Diese komplexen Abläufe können natürlich auch Störungen unterworfen sein. Dies ist zum Beispiel der Fall bei einer Virusinfektion, bei der die Expression einzelner Gene der Wirtszelle um- oder abgeschaltet werden kann (Nevins, 1984), wie auch bei der Wirkung mancher onkogener Faktoren, die zu einer Überexpression bestimmter Gene bzw. der Expression vorher reprimierter Gene führen kann (Cavell, 1982; Bishop, 1983).

Die wie erwähnt am häufigsten vorkommende (wahrscheinlich aus Gründen der Rationalität des Zellhaushalts) und best untersuchte Art der Genregulation ist die Kontrolle der Transkription und hierbei besonders die Initiationsregulation.

Den Mechanismus der Transkriptionskontrolle auf Initiationsebene - soweit bisher bekannt - kann man in drei Bereiche einteilen, die zumindest zum Teil voneinander abhängig sind: Das DNA-Methylierungsmuster, die Änderung der Chromatinstruktur und das Einwirken von Transkriptionsfaktoren.

Zunächst zur DNA-Methylierung: In der DNA von Vertebraten ist das Dinukleotid CG statistisch unterrepräsentiert und zudem häufig am C-Atom 5 des Cytosins methyliert, und zwar an beiden Strängen (Doerfler, 1983). Mit Hilfe von Restriktionsenzymen, die CG in ihrer Erkennungssequenz tragen und teils sensitiv, teils nicht sensitiv bezüglich der C-Methylierung schneiden, konnte gezeigt werden, daß aktiv transkribierte Gene stark untermethyliert sind (Kruczek & Doerfler, 1983). Die unmethylierten Bereiche konnten unmittelbar vor der Initiationsstelle des betreffenden Gens lokalisiert werden. Es wird vermutet, daß DNA-Methylierung während der Zelldifferenzierung eine Rolle spielt. So nimmt zum Beispiel während der B-Zellreifung der Methylierungsgrad der Immunglobulinloci ab (Busslinger et al., 1983). Die exakte funktionelle Bedeutung dieser Methylierungsunterschiede ist nach wie vor unklar, man nimmt jedoch an, daß die Methylierung mit der Bindung von Transkriptionsfaktoren interferiert.

Eine Änderung der Chromatinstruktur, eine Entwindung der DNA beispielsweise, kann in der Entfernung von Nukleosomen, lokaler DNA-Aufschmelzung (beides würde die Anlagerung von RNA-Polymerase II an Transkriptionsbereiche auf der DNA erleichtern), oder der Umwandlung eines DNA-Bereiches in Z-DNA-Konformation bewirken. So ist seit langem bekannt, daß Histone die *in vitro* Transkription von DNA blockieren. Für aktive Transkriptionsvorgänge wurden deshalb histonfreie Bereiche auf der DNA postuliert (Brown, 1984), die dann den Zugang von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren ermöglichen sollten. Diese Annahme wurde unterstützt durch Versuche, bei denen gezeigt werden konnte, daß aktiv transkribierte Bereiche anfälliger für Nukleaseaktivität sind - und somit frei von dicht gepackten Histonen - als nicht transkribierte. So konnten sogenannte DNase-hypersensitive Stellen, d.h. Stellen, die besonders leicht zugänglich sind für DNase-Aktivität, meist in der Nähe von Transkriptionsstarts lokalisiert werden (Elgin, 1981).

Daß jedoch eine Lockerung der Chromatinstruktur nicht allein für ein Einsetzen der Transkriptionsaktivität verantwortlich sein kann, konnte am Beispiel der Ovalbuminexpression gezeigt werden. Selbst bei bestehender Öffnung der Chromatinstruktur wurde in Abwesenheit von Östrogen keine Ovalbumin mRNA gebildet (Shepherd et al., 1986). Es sind also weiterhin Transkriptionsfaktoren nötig, die an die DNA binden und direkt oder indirekt die RNA-Polymerase II beeinflussen. Im übrigen werden auch für die Lockerung der Chromatinstruktur Proteine verantwortlich gemacht (Igo-Kemenes et al., 1982).

Um mögliche Angriffspunkte für Transkriptionsfaktoren auf der DNA zu untersuchen, muß man sich zunächst einen eukaryotischen Promotorbereich vorstellen. Eine mRNA wird bei Eukaryonten von der RNA-Polymerase II transkribiert. Startpunkte für die RNA-Polymerase II sind die Promotoren, welche im allgemeinen aus folgenden Sequenzelementen bestehen: Ca. 35 bp stromaufwärts von der Initiationsstelle der Polymerase befindet sich die "TATA"-Box, ein Sequenzelement mit der Konsensussequenz $\text{TATA}_{\text{T}}^{\text{A}}\text{A}_{\text{T}}^{\text{A}}$, das für die korrekte Initiation der Polymerase an der Startstelle +1 verantwortlich ist (Wasylyk & Chambon, 1981). Vielen Promotoren, besonders solchen von "house-keeping" Genen, d.h. Genen, die für Proteine des allgemeinen Zellhaushalts kodieren, fehlen "TATA"-Boxen, und sie enthalten statt dessen CG-reiche Elemente, die oft in nicht methylierten Bereichen liegen (Bird, 1986).

Weiterhin gibt es im Bereich von -110 bis -40 sogenannte "upstream elements". Dies sind Sequenzbereiche, die Bindungsstellen für eine Reihe von Faktoren aufweisen können (Dyran & Tjian, 1985). Es handelt sich meistens um universelle Faktoren, wie z.B. Spl (Briggs et al., 1986), sie können aber auch spezifischer Natur sein. Hierzu zählen unter anderem Hormone, die an sogenannte "hormone responsive elements" (HRE) binden und eine meist gewebsspezifische Transkriptionssteigerung bewirken (Schütz, 1988).

Eukaryotischer RNA-Polymerase II-Promotor

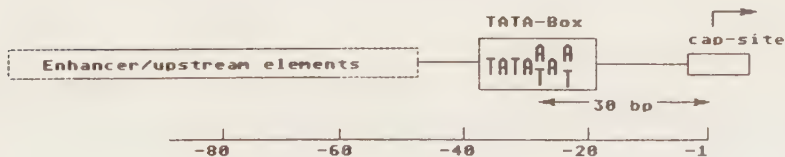


Abb. 1a: Promotorelemente eines eukaryotischen, proteinkodierenden Gens. Das (die) Enhancerelement(e) kann (können) auch in größerer Entfernung zur Startstelle der RNA-Polymerase II (cap-site) bzw. am 3'-Ende des Gens liegen (nach Serfling et al., 1985).

Eine weitere Klasse von Sequenzbereichen, die für die Transkription durch RNA-Polymerase II wichtig sein können, sind Enhancer-Elemente (Khoury & Gruss, 1983). Diese haben die Eigenschaft, die Syntheserate von mRNA zu erhöhen, unabhängig von der Distanz zu dem Promotor, den sie stimulieren und unabhängig auch von ihrer Orientierung. Der Enhancereffekt wurde zuerst bei Simian Virus 40 (SV40) entdeckt, und konnte durch Deletionsmutanten in den beiden 72 bp Repetitionen, die stromaufwärts von der frühen Startstelle liegen, lokalisiert werden (Weiher et al., 1982; Gruss et al., 1981). Später wurden Enhancer auch in anderen Viren - hauptsächlich vor den frühen Genen - und in Zellen höherer Eukaryonten gefunden (Gluzman & Shenk, 1983). Zum Teil weisen diese Enhancer strikte Zellspezifität auf wie z.B. der Immunglobulin-Enhancer oder die Enhancer der Gene von Chymotrypsin und Insulin (Banerij et al., 1983; Walker et al., 1983), zum Teil sind sie unabhängig von der Zellart aktiv und können auch heterologe Promotoren aktivieren. Auch eine Wirtsspezifität mancher Enhancer-Elemente ist zu beobachten. So führte ein Austausch des SV40-Enhancers gegen entsprechende Sequenzen des Mouse Moloney Sarcoma Virus (MMSV) zu verminderter T-Antigen-Expression in Affenzellen, dem natürlichen Wirt von SV40, jedoch in Mauszellen ließ es sich exprimieren (Laimins et al., 1982).

In den meisten Fällen sind Enhancer am 5'-Ende der kodierenden Region, deren Promotor sie stimulieren, lokalisiert. Es gibt jedoch auch die Möglichkeit, daß sie am 3'-Ende liegen (Lusky et al., 1983; Krimpenfort et al., 1988) oder sich im Intron eines Gens befinden (Banerij et al., 1983).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten auch zeigen, daß ein Enhancer aus einzelnen Sequenzmotiven zusammengesetzt ist, die in unterschiedlicher Zusammensetzung aktiv sein und unterschiedliche Wirkungsspektren haben können. So konnte z.B. gezeigt werden, daß der SV40-Enhancer aus verschiedenen faktorenbindenden und synergistisch wirksamen Bereichen besteht (Herr & Clarke, 1986). Ebenso wurde die unterschiedliche Zellspezifität der einzelnen Elemente bewiesen (Voss et al., 1986; Schirm et al., 1987). All diese Sequenzmotive wirken in ihrer spezifischen Anordnung zusammen und machen erst in ihrer Gesamtheit den eigentlichen Enhancereffekt aus (Zenke et al., 1986).

Die genaue Wirkungsweise von Enhancern ist unbekannt, man weiß jedoch, daß sie Transkriptionsfaktoren binden, die dann ihrerseits (wahrscheinlich unter Ausbildung einer DNA-Schleife) die RNA-Polymerase II selbst oder Polymerase-assoziierte Faktoren kontaktieren und damit stimulieren (Dunn et al., 1984; Ptashne, 1986). Von solchen Transkriptionsfaktoren wird somit angenommen,

daß sie eine DNA-bindende und eine Protein-Interaktionsdomäne besitzen. Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Enhancern wurden nur in begrenztem Umfang gefunden. Ein relativ häufig auftretendes Motiv ist das sogenannte Enhancer "core" Element 5'-GTGG^{AAA}_{TTT}G-3' (Weiher et al., 1982; Laimins et al., 1982), das zunächst als wichtig für die Funktion des SV40 Enhancers erkannt wurde. Ein weiteres, in mehreren Enhancern konserviertes Motiv ist die Sequenz ^A_CGGAAGTGA^A_C, die zuerst im Enhancer des E1A Gens des Adenovirus Typ 5 entdeckt wurde (Hearing & Shenk, 1983).

Inzwischen wurden eine Reihe weiterer Enhancermotive gefunden und untersucht (Wingeder, 1988; Jones et al., 1988).

Die einzelnen Sequenzmotive von Enhancern sind meist funktionell redundant, d.h. der Ausfall eines Motivs kann oft durch Verdopplung eines zweiten kompensiert werden (Herr & Gluzman, 1985; Clarke & Herr, 1987).

Enhancer sind vor allem deswegen interessant, weil sie wahrscheinlich an der differentiellen Genexpression beteiligt sind. So spielen während der Determination und Differenzierung von Zellen sowie bei Transformationsvorgängen Enhancer sicher eine Rolle. In Experimenten mit transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, daß nach dem Einbringen von DNA der frühen Gen-Regionen von SV40 Tumore in Mäusen erzeugt wurden, nicht jedoch, wenn der Enhancer deletiert war. Ebenso konnten die Zielorgane solcher Tumoren durch den Ersatz des SV40-Enhancers mit anderen zellspezifischen Enhancern verändert werden (Palmiter & Brinster, 1985).

Das Auffinden neuer Enhancerelemente könnte somit weiterhelfen, solche Prozesse aufzuklären, sowie zur Identifikation bisher unbekannter Regulationsgene führen.

Es wurden bereits verschiedene Versuche zur Isolierung zellulärer Enhancer unternommen. Ein Ansatz dazu war die von Weber et al. (1984) entwickelte "Enhancerfalle". Dabei wurde ein SV40-Virus, bei dem der Enhancer deletiert war, zusammen mit verschiedenen DNA-Fragmenten kotransfiziert und die nach intramolekularer Rekombination und Integration eines Enhancers entstandenen replizierenden Viruspartikel isoliert. Dies führte zur Rekrutierung anderer viraler Enhancer, jedoch konnten keine zellulären Enhancerelemente gefunden werden.

Ein weiterer Versuch wurde von Fried et al. (1983) vorgenommen. Hierbei wurden Maus-DNA-Fragmente in ein enhancerloses Polyomavirus kloniert und permissive Zellen transformiert. Dies hat inzwischen zu der Isolierung eines transkriptionsaktivierenden Maus-Elements geführt (von Hoyningen-Huene et al., 1986).

Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, aus dem Genom einer Hamsterzelllinie Transkriptionskontrollsequenzen zu isolieren und zu charakterisieren.

Hierzu war geplant, einen Enhancer-defekten und damit funktionsunfähigen SV40-Promotor vor das bakterielle Neomycin(neo)-Resistenzgen zu schalten und mit diesem Plasmid embryonale Hamsternierenzellen zu transfizieren. Die Zellen sollten anschließend in Geneticin(G418)-haltigem Medium kultiviert werden. Geneticin ist ein für Säugerzellen toxisches Antibiotikum, gegen das durch die Expression des neo-Gens eine Resistenz vermittelt werden kann. Da in den transfizierten Zellen das neo-Gen aber unter der Kontrolle eines inaktiven Promotors stand, war zunächst keine Resistenz der Zellen gegenüber G418 zu erwarten. Das Auftreten resistenter Zellklone kann damit erklärt werden, daß durch Integration des Plasmids in das Hamstergenom der ursprünglich defekte Promotor wieder funktionsfähig wird. Diese funktionelle Komplementation könnte durch ein der Integrationsstelle benachbartes zelluläres Transkriptionskontrollelement vermittelt werden.

Deshalb war beabsichtigt, aus den resistenten Zellklonen die an das Plasmid angrenzenden zellulären Integrationssequenzen zu isolieren und ihre transkriptionsstimulierenden Eigenschaften zu untersuchen.

In einem zweiten Transfektionsschritt sollten dann Klone, die eine Einzelkopieintegration des Resistenzplasmids aufwiesen, selektioniert werden. Der Gedanke hierbei war, sowohl die Isolierung eines zellulären DNA-Bereichs neben einem zwar integrierten, aber nicht transkribierten neo-Gen zu vermeiden, als auch die Auswahl von Klonen, die unter dem Einfluß eines besonders stark transkriptionsaktivierenden Elements standen, zu erleichtern.

Hierzu war eine erneute Transfektion von BHK-Zellen vorgesehen, diesmal mit DNA-Fragmenten einzelner G418-resistenter Zellklone aus der 1. Transfektionsrunde.

Daraufhin sollte es möglich sein, die für die Expression des neo-Gens in den resistenten Zellklonen verantwortlichen genomischen DNA-Sequenzen, die einen funktionsfähigen SV40-Promotor rekonstituiert hatten, zu klonieren.

Ein bedeutender Aspekt hierbei war der Versuch, die Klonierung durch eine Amplifikation des Einzelkopie-DNA-Fragments zu erleichtern. Hierzu war beabsichtigt, einzelne resistente Zellklone nach der 2. Transfektionsrunde mit COS-1-Zellen zu fusionieren. Die Voraussetzung dafür ist, daß von COS-1-Zellen konstitutiv synthetisiertes T-Antigen an den intakten Origin-Bereich des integrierten Plasmids bindet und mit Hilfe des ebenfalls durch diese Zellen eingebrachten permissiven Faktors einen Replikationsvorgang startet. Damit ist eine Amplifikation sowohl des Plasmids wie auch der angrenzenden zellulären Bereiche möglich.

Anschließend war beabsichtigt, die amplifizierten zellulären Sequenzen zu klonieren und ihre transkriptionsaktivierenden Eigenschaften zu untersuchen.

Eine schematische Darstellung des Versuchsplans ist in Abb. 1b dargestellt. Zur Überprüfung der Promotorstimulation sollten die zellulären Elemente zusammen mit dem defekten SV40-Promotor vor das CAT-Gen kloniert und transiente Expressionstests durchgeführt werden. Ebenso war geplant, mögliche Enhancereigenschaften aufzudecken. Hierzu war beabsichtigt, CAT-Aktivitätstests durchzuführen, in denen die zellulären Sequenzen in veränderter Entfernung und Orientierung bezüglich des defekten Promotors vorlagen. Weiterhin war die Untersuchung der Transkriptionsaktivierung in verschiedenen Zelllinien vorgesehen.

Durch eine Sequenzierung der zellulären Elemente und anschließende Sequenzvergleiche sollte es möglich sein, eventuelle Homologien zu bekannten Transkriptionsaktivatoren aufzudecken.

Der abschließende Gedanke war, eine genomische Bank von BHK-Zellen anzulegen und die Gene des Hamstergenoms, die von den Aktivatoren kontrolliert werden und eventuell zu einer Klasse hochspezifisch regulierter Transkriptionseinheiten gehören, zu isolieren und ihre Expression zu untersuchen.

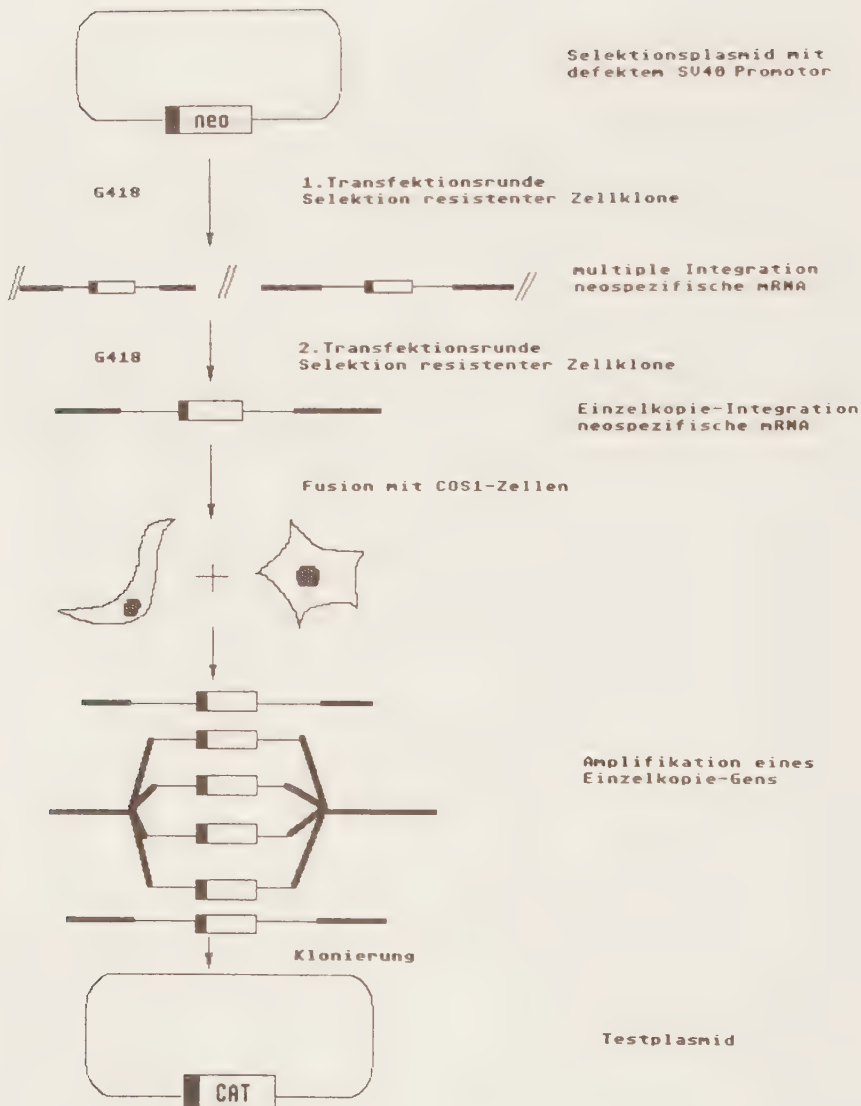


Abb. 1b: Schematische Darstellung der Selektion von Transkriptionskontrollsequenzen

Offene Boxen repräsentieren das neo-Selektionsgen bzw. das CAT-Testgen, der ausgefüllte Bereich stellt den defekten Promotor dar. Plasmid-DNA ist als einfache Linie gekennzeichnet, zelluläre DNA als breite Linie.

2. MATERIALIEN

2.1. Zelllinien, Bakterien, Phagen und Plasmide

Zelllinien:

BHK	embryonale Hamsternierenzellen (Macpherson & Stoker, 1962)
COS-1	CV-1 Affennierenzellen, transformiert durch eine klonierte, Origin-defekte SV40 Deletionsmutante (Gluzman, 1981)
HeLa	Zelllinie eines humanen Gebärmutterkarzinoms (Gey et al., 1952)
TC7	Affennierenzellen (Robb & Huebner, 1973)
L-Zellen	Mausfibroblasten

Bakterien (E. coli):

HB 101	zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969)
BHB 2688 , BHB 2690	zur Herstellung von Verpackungsextrakten für λ -Phagen (Hohn, 1979)
K 803	Infektionskultur für den λ -Phagen EMBL 3A ⁺ (Wood & Lee, 1966)

Phagen (λ):

EMBL 3A ⁺	Klonierungsvektor (Frischauf et al., 1983)
----------------------	--

Plasmide:

pUC 12; pUC 13; pUC 18; pUC 19	(Vieira & Messing, 1982)
pSPT 18; pSPT 19	(Melton, 1984)
pTK CAT	(McKnight, 1980)
pSV0 CAT; pSV2 CAT	(Gorman et al., 1982)

Alle hier aufgeführten Zellen, Bakterien, Phagen und Plasmide wurden aus der Stammsammlung des Arbeitskreis Fanning bereitgestellt.

2.2. Enzyme

Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs, Schwalbach; Pharmacia, Freiburg; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim bezogen.

Andere Enzyme

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

DNA Polymerase I, T4-DNA Ligase

New England Biolabs, Schwalbach:

alkalische Phosphatase, DNA Polymerase I, T4-DNA Ligase

E. Merck AG, Darmstadt:

Proteinase K aus Pilzen

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

Desoxyribonuklease I, DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)

Serva, Heidelberg:

Lysozym, Ribonuklease A

2.3. Chemikalien und andere Materialien

Amersham Buchler GmbH, Braunschweig: α - ^{32}P -dCTP (3000 Ci/mmol), α - ^{35}S -ATP (650 Ci/mmol), γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol), Multiprime DNA Labeling System

Biochrom KG, Berlin: Fötales Kälberserum

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA: Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Yeast-Extract

Gibco/BRL GmbH, Eggenstein: DME, Fötales Kälberserum (FKS)

Kodak Limited: Röntgenfilme XAR-5, X-Omat S

LKB, Gräfelfing: Macrophor Elektrophoresesystem mit Makrodrive & Spannungsquelle

E. Merck AG, Darmstadt: Ammoniumacetat, Borsäure, 1-Butanol, Kalziumchlorid, Chloroform, Diethylether, Dinatriumhydrogenphosphat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylendinitrioltetraessigsäure (EDTA), Ethanol p.A., Essigsäure p.A., Glucose, Glycerin, Harnstoff, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumacetat, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, 2-Mercaptoethanol, Methanol, Natriumacetat, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylhydrogensulfat (SDS), Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Phenol, Polyethylenglycol (PEG 6000 und 1000), Phosphorsäure 85%, Salzsäure 25%, Saccharose, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Zinkchlorid

New England Nuclear, Dreieich: ^{14}C -Chloramphenicol

Nunc GmbH, Wiesbaden: Gewebekulturschalen, Zellkulturflaschen

Otto Aldag, Hamburg: NZ-Amin

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg: Acetyl-CoA, DEAE-Dextran, Dextransulfat, Ficoll 400, Nick columns

Rühl-Chemie, Friedrichsdorf: Cäsiumchlorid

Schleicher und Schuell, Dassel: DEAE-Cellulose-Membran, NA-45, Nitrocellulosefilter

Serva, Heidelberg: Acrylamid, Ammoniumperoxidisulfat, Ampicillin, Bromphenolblau, Ethidiumbromid, N,N'-Methylbisacrylamid, Penicillin, Streptomycin, Tetramethylethylendiamid (TEMED), Triton X-100, Trypsin, Visking-Dialysesschläuche

Sigma Chemie, Deisenhofen: Agarose Typ VII, Dithiothreitol (DTT), 3(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (Hepes), Nonidet P-40, Polyvinylpyrrolidon, Rinderserumalbumin, RNase H, Spermidin, Triethanolamin

United States Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, USA: Sequenase kit

Whatman Limited, Springfield Mill, Maidstone, Kentucky, USA: 3-MM-Papier

2.4. Puffer, Medien und Lösungen

CIA:

24 Vol Chloroform
1 Vol iso-Amylalkohol

LB-Medium(1 l):

10 g Trypton
5 g Yeast-Extract
5 g NaCl

SM-Medium:

50 ml Tris/HCl pH 7,5
5,8 g NaCl
2 g $MgCl_2$
1 g Gelatine
950 ml H_2O

Stoppuffer:

10% Ficoll 400
0,2% Bromphenolblau
50mM EDTA

10xTEB:

0,89 M Tris
25 mM EDTA
0.89 M Borsäure

10xDenhardt's:

0,2% Rinderserumalbumin
0,2% Ficoll
0,2% Polyvinylpyrrolidon

NZCY-Medium(1 l):

10 g NZ-Amin
5 g NaCl
5 g Yeast-Extract
2 g $MgSO_4 \times 2 H_2O$
1 g Casaminosäuren

20xSSC:

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA

3. METHODEN

3.1. Zelikultur

3.1.1. Zellkultivierung

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DME-Medium mit 5% FKS auf kollagenbeschichteten Plastikpetrischalen bei 37°C in einem CO₂-Brutschrank (5% CO₂) vermehrt. Konfluente Zellen wurden passagiert, indem sie 5 min mit einer 0,1% Trypsinlösung inkubiert wurden, anschließend durch kurzes Abzentrifugieren pelletiert und nach Resuspension in etwas Medium auf Platten mit frischem Medium und Serum verteilt.

3.1.2. Aufbewahren von Zelllinien

Die Zellen wurden durch kurzes Abzentrifugieren pelletiert, in DME mit 10% DMSO und 20% FKS aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Nach 24 h wurden sie zur weiteren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2. Bakterienkultur

3.2.1. Vermehrung von Bakterien

5 ml autoklaviertes LB-Medium wurden mit Ampicillin (50 mg/l) versehen und mit einer Bakterieneinzelkolonie angeimpft. Die Bakterien wurden unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2. Aufbewahren von Bakterienstämmen

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden 0,9 ml einer Übernachtskultur mit 900 µl Glycerin versehen und bei -80°C aufbewahrt. Davon wurde bei Bedarf, nach unvollständigem Auftauen, mit einer Impfpöse ein Inokulum entnommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen.

3.3. Phagen

3.3.1. Präparation von Bakterien zur Transformation

100 ml eines autoklavierten NZCY-Mediums wurden mit einer Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes K 803 angeimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 20 min, 2500 rpm, 4°C) geerntet und in 50 ml autoklaviertem SM-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde bei 4°C aufbewahrt und maximal 2 Wochen verwendet.

3.3.2. Titerbestimmung und Präparation von Stocklösungen

Aus einer Reihenverdünnung wurden aus den Verdünnungsbereichen 10^{-3} - 10^{-7} je 10 µl der Phagensuspension entnommen, zu 90 µl einer Infektionskultur pipettiert und damit vermischt. Die infizierten Bakterien wurden 20 min bei 37°C inkubiert, bevor sie nach Zugabe von 3 ml warmer (55°C) Topagarose (0,5 % Agarose, 10 mM $MgSO_4$) auf warme (37°C) NZCY-Platten gegossen wurden. Nach Erstarren der Topagarose bei RT wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Auszählen der Plaques bei geeigneten Verdünnungsstufen wurde der Titer errechnet.

Zur Herstellung einer Phagenstocklösung wurden 90 µl einer Infektionskultur mit 10^5 pfu einer Phagensuspension infiziert und ausplattiert (s.o.). Nach vollständiger Lyse der Bakterien wurde die Platte mit 4 ml SM-Medium überschichtet und mindestens 4 h bei 4°C aufbewahrt. Danach wurde das SM-Medium mit einer Pipette abgezogen und der Titer bestimmt. Die Stocklösungen wurden mit 40 µl Chloroform versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Stocklösungen enthielten üblicherweise einen Titer von 10^9 - 10^{11} pfu/ml.

3.4. Präparation und Analyse von DNA

3.4.1. Präparation chromosomaler DNA aus tierischen Zellen

Die Mengenangaben beziehen sich auf fast konfluente 140 mm Zellkulturschalen. Die Zellen wurden dreimal mit kalter Hanks-Lösung gewaschen und anschließend mit 3 ml TE pH 8,0, 1% SDS überschichtet. Die zähe Zellsuspension wurde mit einem Gummischaber abgeschabt, in Plastikröhrchen überführt, mit 150 µl vorinkubierter Proteinase K-Lösung (5 mg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 7,2) versehen und 2 h bei 37°C inkubiert. Es erfolgte eine zweimalige Phenol-extraktion und anschließend Dialyse gegen TE-Puffer pH 7,5 (6x Pufferwechsel). Danach wurde eine bei 80°C vorinkubierte RNase-Lösung (200 µg/ml in 5 mM Tris/HCL pH 7,5) zu einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde noch einmal 1 h bei 37°C mit Proteinase K behandelt (Endkonzentration 100 µg/ml). Es wurde zweimal mit Phenol extrahiert und zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) und wiederum gegen TE-Puffer pH 7,5 (6-8x Pufferwechsel) dialysiert (Sutter et al., 1978).

Die Konzentration der DNA wurde anschließend durch Messung der Absorption bei 260 nm in einem Spektralphotometer bestimmt ($1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml DNA}$).

3.4.2. Präparation niedermolekularer DNA aus tierischen Zellen

Die Zellen einer 100 mm Gewebekulturschale wurden mit kalter Hanks-Lösung gewaschen, nach Zugabe von 2,5 ml TE pH 7,5 mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Zellen aufzuschließen, wurden 150 µl einer 10%igen SDS-Lösung zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 150 µl vorinkubierter Proteinase K-Lösung (5 mg/ml in 10 mM Tris/HCL pH 7,2) wurde nochmals für 1,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend 0,15 Vol 5 M NaCl vorsichtig beigemischt. Das Lysat wurde bei 4°C 12-16 h stehengelassen, wobei Proteine und hochmolekulare DNA ausfielen. Nach 90 min Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C (SS34-Rotor) wurde der Überstand gewonnen und daraus die niedermolekulare DNA durch Zugabe von 2,5 Vol Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde nach Trocknung in TE pH 7,5 aufgenommen und zweimal phenolisiert. Nach einer weiteren Fällung mit Ethanol und einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde die DNA in TE pH 7,5 (1-2 ml) gelöst und weiterverarbeitet (Hirt, 1967).

3.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA über Dichtegradientenzentrifugation

Von einer Einzelkolonie wurde eine 5 ml Übernachtskultur angelegt und mit dieser eine 500 ml Hauptkultur (autoklaviertes LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin) angeimpft, die dann 15–20 h bei 37°C geschüttelt wurde. Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation geerntet (GSA-Rotor, 10 min, 5000 rpm, 4°C), das Zellsediment in 6 ml Resuspensionspuffer (40 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 25 % Saccharose) aufgenommen, auf Eis gestellt und mit 1 ml Lysozymlösung (2 mg/ml) versetzt. Nach 5 min wurden 1 ml EDTA (0,5 M) und nach weiteren 10 min 10 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 60 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) zugegeben. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde die viskose Suspension homogenisiert und 1 h bei 17000 rpm und 4°C (SS34-Rotor) zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und das Volumen bestimmt. Pro ml Überstand wurden 1 g Cäsiumchlorid und 10 mg Ethidiumbromid zugegeben. Anschließend wurde in einem Beckman VTi50-Rotor 17–20 h bei 45000 rpm und 20°C zentrifugiert. Die unter langwelligem UV-Licht (366 nm) fluoreszierende Plasmidbande wurde mit einer Spritze durch seitliches Punktieren entnommen und anschließend erneut zentrifugiert (Sorvall Rotor TV865 55000 rpm, 5 h, 20°C). Die Plasmidbande wurde wieder durch seitliches Punktieren abgezogen und zur Entfernung des Ethidiumbromids mehrmals mit Isopropanol (mit CsCl und H₂O gesättigt) extrahiert. Anschließend wurde 2 Tage bei mehrmaligem Pufferwechsel gegen TE-Puffer pH 7,5 dialysiert. Die Konzentration der DNA wurde durch Messen der OD₂₆₀ bestimmt und der Reinheitsgrad über das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ (sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen) bestimmt. Die DNA-Ausbeute lag in der Regel bei 200–800 µg/l Bakterienkultur, variierend mit Art und Größe des Plasmids. Durch die zweimalige Zentrifugation wurde eine Selektion auf superhelikale Plasmidformen erreicht (Vinograd et al., 1963).

3.4.4. Schnellmethode zur Isolierung von Plasmid-DNA

Von einer Einzelkolonie eines plasmidhaltigen Bakteriums wurde eine Übernachtskultur angelegt. Von dieser wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl eiskalter Lysozymlösung (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 4 mg/ml Lysozym) aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 µl eiskalter, frisch zubereiteter 0,2 M NaOH, 1% SDS-Lösung zugegeben und die Suspension 5 min auf Eis gestellt. Zu der inzwischen klaren Lösung wurden 150 µl Kaliumacetat (60 ml 5 M KAc, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml H₂O) zugegeben. Die ausgefallenen Proteine sowie hochmolekulare DNA

wurden nach weiteren 5 min im Eisbad durch Zentrifugation sedimentiert (Eppendorffzentrifuge, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde zweimal mit Phenol und zweimal mit CIA extrahiert, wobei die durch Zentrifugation getrennte wässrige Phase jeweils in ein frisches Eppendorfgefäß überführt wurde. Nach einer Ethanolfällung und anschließendem Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA getrocknet und in 50 µl TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen. Für einen Restriktionsverdau wurde die DNA mit 5 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt (Maniatis et al., 1982; Birnboim & Doly, 1979).

3.4.5. Isolierung von λ-Phagen-DNA

Von 100 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* K 803 wurde die OD₆₀₀ gemessen und daraus die Anzahl der Bakterien berechnet ($1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$). Zweimal jeweils 10^{10} Zellen wurden abzentrifugiert (SS34-Rotor, 20 min, 2500 rpm, 4°C) und das Pellet in je 5 ml SM-Lösung resuspendiert. Nach Infektion mit je 10^8 pfu der Phagenstocklösung wurden die infizierten Kulturen 20 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Jede der beiden Infektionskulturen wurde danach zu 1 l beim 37°C vorgewärmtem NZCY-Medium gegeben und bei 37°C geschüttelt. Nach 14 h war eine deutliche Lyse der Zellen zu erkennen. Durch Zugabe von 20 ml Chloroform/l Bakterienkultur und weiterem Schütteln bei 37°C für 30 min wurde eine vollständige Lysis erreicht.

Zu der bei RT abgekühlten Kultur wurden 58,5 g NaCl/l gegeben und unter Rühren gelöst. Anschließend wurde die Suspension 1,5 h auf Eis inkubiert und die Bakterien durch Zentrifugation (Sorvall GSA-Rotor, 10 min, 8000 rpm, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde mit PEG 6000, das unter Rühren bei RT gelöst wurde, bis zu einer Endkonzentration von 10% (w/v) versetzt und weitere 4 h auf Eis inkubiert. Die mit PEG 6000 gefällten Phagen wurden durch Zentrifugation (Sorvall GSA-Rotor, 10 min, 9000 rpm, 4°C) geerntet und in insgesamt 24 ml SM-Medium resuspendiert.

Es wurde ein gleiches Volumen Chloroform zugegeben und die wässrige Phase mit den Phagen von der organischen Phase durch kräftiges Schütteln und anschließender Zentrifugation (SS34-Rotor, 10 min, 1500 rpm, 4°C) abgetrennt. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 0,75 g CsCl/ml Überstand versetzt und in einem Sorvall TV865-Rotor zentrifugiert (4 h, 47000 rpm, 20°C). Die bei senkrecht einfallendem Licht gut sichtbaren, bläulich schimmernden Banden wurden durch seitliches Punktieren abgezogen und zur Entfernung des CsCl zweimal je 1 h gegen 4 l Puffer (10 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂) dialysiert.

Die Phagensuspension wurde dann mit 12,5 µl einer Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) und 100 µl EDTA (0,5 M) versetzt, das Volumen mit sterilem, bidestilliertem H₂O auf 2,5 ml aufgefüllt und 1 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung dreimal mit Phenol und zweimal mit CIA ausgeschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 10 min, 1500 rpm, 4°C) getrennt. Nach Zugabe von 0,1 Vol Natriumacetat (3 M) wurde die wässrige Phase mit einem gleichen Volumen Isopropanol vorsichtig überschichtet und die DNA durch Vermischen der Phasengrenze mit einer Pasteurpipette, deren Ende zugeschmolzen und hakenförmig aufgebogen war, aufgewickelt. Nach leichtem Trocknen an der Luft wurde die DNA mit 70 µl % Ethanol gewaschen und wieder getrocknet. Durch leichtes Drehen der Pipette in TE-Puffer wurde die DNA abgelöst und zur vollständigen Lösung 24 h bei 4°C aufbewahrt (Blattner et al., 1977; Maniatis et al., 1978).

Die DNA-Konzentration wurde durch Messen der OD₂₆₀ bestimmt (1 OD₂₆₀ = 50 mg/ml DNA). Aus 2 l einer Infektionskultur wurden 700-800 µg Phagen-DNA gewonnen.

3.4.6. Phagenschnellaufschlüsse

Der zu untersuchende Phagenplaque wurde mit einer Pasteurpipette aus der Agarplatte ausgestochen und in 500 µl SM-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. 250 µl dieser Lösung wurden mit 25 µl einer Infektionskultur (E. coli K 803) vermischt und 20 min unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 4 ml NZCY-Medium zugegeben und die Kultur über Nacht weiter bei 37°C geschüttelt.

Zur vollständigen Lyse wurden 100 µl Chloroform zugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die bakteriellen Reste wurden durch Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor, 10 min, 8000 rpm, 4°C) vom Überstand getrennt, der in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde und zu dem RNase A und DNase I zu einer jeweiligen Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben wurde. Nach Inkubation dieser Lösung (1 h, 37°C) wurden die Phagen durch Zugabe eines gleichen Volumens SM-Medium mit 20 % PEG 6000 und 2 M NaCl und durch 1 h Inkubation auf Eis gefällt. Die Phagen wurden dann durch Zentrifugation (Sorvall SS34-Rotor, 20 min, 10000 rpm, 4°C) geerntet.

Der Überstand wurde abgegossen und das Reaktionsgefäß in gestürzter Position zum Trocknen auf ein Papiertuch gestellt.

Zur Entfernung des PEG und etwaiger bakterieller Überstände wurde das Pellet in 500 µl SM-Medium gründlich resuspendiert und erneut abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 2 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, mit 5 µl einer 10%igen SDS-Lösung und 5 µl EDTA (0,5 M) versetzt und 15 min bei 65°C inkubiert. Die Lösung wurde zweimal mit Phenol und zweimal mit CIA extrahiert, wobei die wässrige Phase jeweils nach Zentrifugation in ein neues Gefäß überführt wurde. Die DNA wurde dann mit einem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und bei -80°C 30 min lang ausgefällt. Anschließend wurde die Suspension bei RT aufgetaut, abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 15 min, 4°C), mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 60 µl TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen. Jeweils 5 µl wurden mit 1 µg RNase A versetzt und für den Restriktionsverdau eingesetzt. (Leder et al., 1977)

3.4.7. Auftrennung von DNA auf Agarosegelen

Zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet:

0,6% Agarose bei genomischer DNA und Fragmenten von 5-20 kb

1% Agarose bei Fragmenten von 0,8-5 kb

2% Agarose bei Fragmenten von 0,1-1 kb

Die Agarose wurde in Tris-EDTA-Borat-Laufpuffer aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 60°C in vorbereitete Apparaturen gegossen (30 ml für Minigele, 150 ml für große Gele). Die Auftragstaschen wurden durch Verwendung unterschiedlicher Kämme hergestellt.

Nach Erkalten des Gels (ca. 1 h bei RT) wurde die DNA aufgetragen und in einem Spannungsgradienten aufgetrennt. Im Falle der großen Gele lief die Elektrophorese 12-14 h bei ca. 30 mA, bei den Minigelen 40-60 min bei ca. 60 mA. Im Anschluß wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/l) angefärbt, die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera unter Verwendung eines Rotfilters fotografiert (Film: Polaroid Typ 107).

3.5. Präparation und Analyse von RNA

3.5.1. Isolierung von RNA aus tierischen Zellen

Ein konfluenter Zellrasen von 140 mm Gewebekulturschalen wurden dreimal mit kalter (4°C) Tris-Saline-Lösung gewaschen. Danach wurden je 2 ml eiskalten Puffer A (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl, 0,1% Diethylpyrocarbonat) zugegeben, die Zellen mit einem Gummischaber abgeschabt und abzentrifugiert (SS34-Rotor, 2 min, 5000 rpm, 4°C). Das erhaltene Zellpellet wurde mit 2 ml eiskaltem Lysispuffer (Puffer A mit 0,5% NP-40; 0,1% Diethylpyrocarbonat) versetzt, gut gemischt (Vortex) und 8 min im Eisbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (SS34-Rotor, 5 min, 5000 rpm, 4°C) erhielt man ein weißes Kernpellet (kann zur DNA-Isolierung verwendet werden) und den RNA-haltigen Überstand. Dieser wurde dreimal mit Phenol, einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit CIA extrahiert. Die wässrige Phase wurde dabei nach Zentrifugation jeweils in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 1/10 Volumen Natriumacetat (3M) und 2 Volumen eiskalten Ethanol zugegeben und die RNA-haltige Lösung bei -20°C aufbewahrt (Favaro et al., 1980).

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 500 µl abzentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 15 min, 4°C), getrocknet, in 500 µl TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen und die OD_{260} spektralphotometrisch bestimmt (1 OD_{260} = 30 µg/ml RNA).

3.5.2. Auftrennung von RNA auf Glyoxalgele

Um die Vollständigkeit und die Konzentration einer RNA elektrophoretisch zu bestimmen, wurden Glyoxalgele verwendet (McMaster & Carmichael, 1977).

Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel in 10 mM NaH_2PO_4 -Puffer pH 6,5 hergestellt und die Elektrophorese ebenfalls in 10 mM NaH_2PO_4 -Puffer pH 6,5 unter ständiger Durchmischung (Magnetrührer) des Laufpuffers beider Pufferkammern und pH-Wert-Kontrolle durchgeführt (4-5 h, 80 mA).

10 µg der RNA wurden durch Zentrifugation gefällt, getrocknet und in 20 µl Probenpuffer (100 µl vorbehandeltes Glyoxal, 250 µl DMSO, 17 µl NaH_2PO_4 pH 6,5, 133 µl steriles bidestilliertes H_2O) aufgenommen. Diese Auftragsmischung wurde dann entweder für 1 h bei 52°C inkubiert oder über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Für die Elektrophorese wurde dann noch 1 µl konzentriertes Bromphenolblau zugegeben.

Anschließend wurde das Gel 1 h in 150 ml 50 mM NaOH denaturiert, weitere 30 min in 150 ml 0,1 M KH_2PO_4 pH 7,0 mit 50 µg/ml Ethidiumbromid neutralisiert und anfärbt. Die RNA konnte wie unter 3.4.7. beschrieben unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.5.3. Auftrennung von RNA auf Formaldehydgelen

Es wurde ein 1,5%iges Agarosegel in 1/10 Vol 1xMOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM NaAc, 1 mM EDTA; pH 7,0) und 1/6 Vol Formaldehyd (filtriert) hergestellt. Der Laufpuffer für die Elektrophorese war ebenfalls 1xMOPS-Puffer.

15-25 µg RNA wurden durch Zentrifugation gefällt, getrocknet, in 20 µl Probenpuffer (50 µl Formamid, 17 µl Formaldehyd (filtriert), 10 µl 10xMOPS-Puffer pH 7,0, 10 µl 10% Ficoll, 10 µl steriles bidestilliertes H₂O, 4 µl konzentriertes Bromphenolblau) aufgenommen und 20 min bei 65°C inkubiert.

Die Elektrophorese erfolgte 3-4 h bei ca. 80 mA (pH-Kontrolle).

Das Gel wurde anschließend sofort für den Transfer auf Nitrocellulosefilter verwendet (Lehrach et al., 1977).

3.6. Enzymatische Manipulationen an DNA

3.6.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung wurde die DNA in Konzentrationen von 50 µg/ml bis zu 2 µg/µl eingesetzt und mit entsprechenden 10x konzentrierten Puffern (Zusammensetzung nach den Angaben der Enzymhersteller) auf die benötigten Salzbedingungen eingestellt. Die Spaltungen wurden bei den entsprechenden Temperaturen (meist 37°C) durchgeführt. Pro µg Plasmid-DNA wurden 1-2 Enzymeinheiten eingesetzt und ca. 1 h verdaut, während für genomische DNA 5-10 Einheiten pro µg eingesetzt wurden und die Spaltdauer 5-12 h betrug.

Wenn bei einer Mehrfachspaltung die Enzyme unterschiedliche Pufferbedingungen benötigten, so wurde nacheinander gespalten, mit dem Enzym mit der niedrigsten Salzkonzentration beginnend.

Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,1 Vol Stopppuffer beendet und in die Gelelektrophorese eingesetzt.

3.6.2. Phosphatasebehandlung

Die 5'-Phosphatreste, die nach Spaltung der DNA entstehen, wurden abgetrennt, um eine Verknüpfung der Vektorenden bei einer Ligasereaktion zu verhindern. Dazu wurde die DNA auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gebracht. Mit 5 x RAP-Puffer (0,8 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 M MgCl_2 , 2 mM ZnCl_2) wurden die Salzbedingung eingestellt und die DNA 30 min mit 1 u/ μg der alkalischen Phosphatase bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz 45 min bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit Phenol, zweimal mit CIA und einmal mit Ether extrahiert, bevor die DNA mit Ethanol gefällt, gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer (oder sterilem bidestillierten H_2O) aufgenommen wurde (Maniatis et al., 1982).

3.6.3. In vitro-Markierung von DNA mit α - ^{32}P -dCTP (Nicktranslation)

Um 1 μg Plasmid-DNA mit α - ^{32}P -dCTP radioaktiv zu markieren, wurde wie folgt verfahren:

Aus 0,1 mM Stammlösungen von dATP, dGTP und dTTP wurden jeweils 2,5 μl eingesetzt, sowie 10 μl α - ^{32}P -dCTP (entspricht 100 μCi). Ebenso wurden in das Reaktionsgemisch 1 μg Plasmid-DNA, 1,5 μl 1 M Tris/HCl pH 7,5, 1 μl 0,5 M MgCl_2 , und 1 μl einer DNase-Lösung (1 mg DNase in 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM CaCl_2 , 10 mM MnCl_2) eingesetzt. Diese DNase-Lösung war vorher 1:10 in DNase-Verdünnungspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM MnCl_2) und danach 1:1000 in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 verdünnt worden.

Der Ansatz wurde 1 min bei RT inkubiert, bevor 1 μl DNA-Polymerase I (10 units) zugegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 16°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μl EDTA gestoppt.

Die nicht eingebauten Triphosphate wurden über eine Sephadex G 50 Nicktranslationssäule (Pharmacia) abgetrennt. Dazu wurde die Flüssigkeit über dem Säulenmaterial abgossen, die Säule dreimal mit je 4 ml TE-Puffer durchgespült, das Probenmaterial mit H_2O bidest. auf 50 μl aufgefüllt und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurden zweimal je 400 μl TE-Puffer aufgetragen, wovon die zweiten 400 μl die markierte Probe enthielten und aufgefangen wurden. Die freien Nukleotide verblieben in der Säule, die dann verworfen wurde (Rigby et al., 1977).

3.6.4. Markierung von DNA durch "Oligoprimering"

Eine effiziente Möglichkeit der DNA-Markierung bot das "random prime" oder "oligoprimering"-Verfahren von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984).

Hierzu wurden DNA-Fragmente oder linearisierte Plasmid-DNA in einer Menge von 25 ng (5-10 μ l) 2 min aufgekocht und anschließend sofort auf Eis gestellt. Zu der denaturierten DNA wurden dann 10 μ l Multiprimer-Puffer (enthielt neben Salzen die drei nicht radioaktiv markierten Nukleotide), 5 μ l Primer (Oligonukleotidgemisch aller möglichen Hexamere (N_6), 23 μ l steriles bidestilliertes H_2O , 5 ml α - ^{32}P -dCTP (50 μ Ci) und 2 μ l Klenow-Polymerase zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 3 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation von 2 min bei 95°C und anschließendem Transfer ins Eisbad gestoppt.

Das Reaktionsprinzip beruht darauf, daß die Klenow-Polymerase, nach statistischer Hybridisierung der Oligonukleotide an die Einzelstränge der DNA-Probe, radioaktiv markierte Gegenstränge synthetisiert.

Die nicht eingebauten Triphosphate wurden nach dem beschriebenen Verfahren (3.6.3.) abgetrennt.

Die spezifische Aktivität der DNA bei dieser Methode betrug ca 1×10^9 cpm/ μ g DNA im Vergleich zu 5×10^7 - 1×10^8 cpm/ μ g DNA bei der herkömmlichen Nick-translations-Methode (3.6.3.).

3.6.5. 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden

Das Auffüllen der 5'-Enden von dephosphorylierter DNA mit radioaktivem Phosphat wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase durchgeführt. Hierzu wurde die DNA in 5 μ l TE-Puffer aufgenommen, mit 35 μ l Lösung I (20 mM Tris/HCl pH 9,5, 1 mM Spermidin, 0,05 mM EDTA) versehen und 5 min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen bei RT wurden 5 μ l Lösung II (0,5 M Tris/HCl pH 9,5, 110 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT, 50% Glycerin) zugegeben und gut durchmischt. Dann wurden noch 2 μ l γ - ^{32}P -ATP und 2 μ l Polynukleotidkinase (4 units) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Das nicht eingebaute γ - ^{32}P -ATP wurde über eine Sephadex G 50-Säule von den Oligonukleotiden abgetrennt.

Sequenz des SV40 Origin Oligonukleotids:

5'-**6CC6CCTC66CCTCT6A6CTATTCC6A6TC6T6A66A66C**-3'

Pos. 2

Pos. 5204

3.6.6. Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

DNA-Fragmente wurden mit einem geeigneten Vektor durch T4-DNA-Ligase verknüpft, bevor mit dem Reaktionsprodukt Bakterien transformiert wurden. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert wurde etwa 1 : 4 gewählt, das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 20 µl und die DNA-Menge mindestens 200 ng. Zu der Vektor-DNA und der Fragment-DNA wurden 5 µl 3x Ligase-Puffer (0,5 M Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 200 mM DTT), 1 µl ATP (10 mM) und 2 µl T4-DNA-Ligase zugegeben und der Ansatz entweder 1 h bei 23°C oder 12–16 h bei 16°C inkubiert, bevor er in die Bakterientransformation eingesetzt wurde.

3.7. Charakterisierung von DNA und RNA

3.7.1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Klonierung bestimmter DNA-Fragmente wurden diese nach einem Restriktionsverdau durch Agarosegelelektrophorese von den übrigen Fragmenten abgetrennt und über DEAE-Cellulose-Membran-Filter isoliert.

Dazu wurde das Gel mit langwelligem UV-Licht (366 nm) in einer Auflichtapparatratur bestrahlt und die zu isolierende DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Bande wurde dann erneut in Agarose eingegossen und nach Erkalten wurde hinter die Bande (in 90° Drehung zur ursprünglichen Laufrichtung) ein Schnitt gesetzt. In diesen wurde dann ein vorbehandelter DEAE-Cellulose-Membran-Streifen gesteckt, an den bei der folgenden Elektrophorese die DNA gebunden wurde.

Zur Elution der DNA wurde der Membran-Streifen in 400 µl "high salt"-Puffer (0,15 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl pH 8,0) in einem Eppendorfgefäß 2–4 h bei 68°C inkubiert (mehrmaliges Durchmischen auf dem Vortex).

Danach wurde der Puffer abpipettiert, die Membran mit weiteren 50 µl "high salt"-Puffer gespült und die vereinigten Lösungen mit 1,2 ml n-Butanol (H₂O-gesättigt) zur Entfernung des Ethidiumbromids extrahiert. Nach Zentrifugation wurde die obere, organische Phase verworfen und die DNA-haltige Phase durch Zugabe von 2,5 Vol Ethanol (abs.) 1 h bei -80°C gefällt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 20 min, 15000 rpm, 4°C) gefällt, getrocknet und in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. In einem zweiten Fällungsschritt wurden 20 µl Natriumacetat (3 M) und 500 µl Ethanol (abs.) zugegeben und mindestens 5 h bei -80°C gefällt. Anschließend wurde die DNA wieder abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen (Winberg und Hammarskjöld, 1980).

3.7.2. Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA im Agarosegel wurden die DNA-Fragmente zu Einzelsträngen denaturiert. Dazu wurde das Gel 1 h in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) geschwenkt, bevor die gleiche Menge Neutralisationspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl pH 7,4) zugegeben wurde und das Gel noch einmal für 30 min leicht geschüttelt wurde. Danach wurde es auf den vorbereiteten Blotaufbau gelegt, der wie folgt aussah:

Auf einen Plastikrost mit länglichen Einschnitten wurden drei Lagen Whatman 3MM Papier in der Weise gelegt, daß sie durch die Einschnitte hindurch in ein Vorratsgefäß tauchten, das mit 20x SSC gefüllt war. Darauf wurden drei Bogen 3MM Papier in der Größe des Gels gelegt und alles mit 20x SSC gut getränkt, bevor das Gel aufgelegt wurde. Die nicht vom Gel bedeckten Flächen des 3MM Papiers wurden mit Plastikstreifen sorgfältig abgedeckt (Verhinderung eines "Kurzschlusses" durch seitliches Vorbeifließen des SSC). Auf das Agarosegel wurde ein in 20x SSC äquilibrierter Nitrocellulosefilter gleicher Größe gelegt und darauf nochmal drei in 20x SSC getränkte 3MM Papiere von Gelgröße. Der Aufbau wurde dann mit einem 15-20 cm hohen Filterpapierstapel bedeckt und mit einer Glasplatte beschwert. Auf diese wurde nach einigen Stunden noch ein zusätzliches Gewicht von 1-2 kg gestellt. Nach ca. 36 h war der Transfer beendet, wobei zwischendurch die feuchten Papiertücher durch frische ersetzt wurden.

Der Nitrocellulosefilter wurde am Rand markiert und 2 h bei 80°C zur Fixierung der DNA gebacken.

Um die Transfereffizienz zu überprüfen, wurde das Agarosegel nach dem Transfer nochmal mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht kontrolliert, wobei möglichst wenig DNA im Gel verblieben sein sollte (Southern, 1975).

3.7.3. Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulosefilter

Zur Übertragung von RNA auf Nitrocellulose wurde das Formaldehydgel sofort nach der Elektrophorese auf einen unter 3.7.2. beschriebenen Blotaufbau transferiert und analog der für DNA beschriebenen Methode weiter bearbeitet.

3.7.4. Hybridisierung mit *in vitro* markierten Proben

Zur Identifizierung bestimmter DNA(oder RNA)-Sequenzen wurden die an Nitrocellulose gebundenen Nukleinsäuren mit einer entsprechenden radioaktiv markierten DNA-Probe inkubiert. Die Hybridisierungsbedingungen wurden gemäß der zu erwartenden Homologien der beiden Proben gewählt.

Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Nitrocellulosefilter (bis zu 12 Filter bei Abzügen von Phagen- oder Bakterienplatten; 1-2 Filter von DNA- oder RNA-Blots) unter Vermeidung von Luftblasen in 30 ml Vorhybridisierungslösung in einer Polyethylenfolie eingeschweißt und mindestens 4 h bei 42°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Eine nach 3.6.3. oder 3.6.4. markierte DNA-Probe wurde zu 30 ml Hybridisierungslösung pipettiert, in einem verschlossenen Röhrchen zur Denaturierung der DNA-Probe 15 min aufgekocht und anschließend im Eisbad für 15 min abgeschreckt. Die Probe wurde dann nach Entfernung der Vorhybridisierungslösung zu den Filtern gegeben und diese bei 42°C im Schüttelwasserbad 12-16 h inkubiert.

Nach Beendigung der Hybridisierung wurde die Probe abgossen und bei 4°C aufbewahrt (bis zu viermal - nach erneutem Aufkochen und Abschrecken - verwendbar).

Zur Entfernung nicht- bzw. unspezifisch gebundener DNA wurden die Filter zunächst bei RT zweimal für 10 min in 2xSSC, 0,1% SDS gewaschen, anschließend zweimal je 30 min in 0,1xSSC, 0,1% SDS bei 56°C.

Danach wurden die Filter getrocknet, in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat S bzw. X-Omat XAR 5) unter Verwendung einer Verstärkerfolie 5 h bis 10 Tage bei -80°C exponiert.

Um einen Filter ein zweites Mal zu hybridisieren, wurde die alte Probe mit 0,1% SDS bei 90°C abgewaschen (ca. 30 min), der Filter erneut vorhybridisiert und mit einer frisch markierten Probe versetzt.

Vorhybridisierungslösung (1 l): 500 ml Formamid, 200 ml 20xSSC, 50 ml 1 M KH_2PO_4 pH 6,5, 150 ml 100x Denhardt's, 100 ml ultraschallbehandelte, denaturierte Kalbsthymus-DNA 3 mg/ml

Hybridisierungslösung (300 ml): 150 ml Formamid, 60 ml 20xSSC, 6 ml 1 M KH_2PO_4 pH 6,5, 60 ml 50% Dextransulfat, 14 ml 100x Denhardt's, 10 ml ultraschallbehandelte, denaturierte Kalbsthymus-DNA 3 mg/ml

Eine weitere Hybridisierungsmethode, meist für Filterabzüge von Phagen- und Bakterienplatten verwendet, war die Hybridisierung in wässriger Lösung.

Hierzu wurden die Filter 2-4 h bei 60°C in 6xSSC, 0,75% Magermilchpulver vorhybridisiert und anschließend in 30 ml der gleichen Lösung (mit der vorher aufgekochten, radioaktiv markierten Probe) 12-16 h bei 68°C hybridisiert. Die Filter wurden zweimal je 10 min in 2xSSC, 0,1% SDS, 0,25% Magermilchpulver bei RT gewaschen, zweimal je 10 min in 0,1 % SSC, 0,1 % SDS bei 70°C, getrocknet und für die Autoradiographie verwendet.

3.8. Klonieren in Plasmide

3.8.1. Vorbehandlung des Vektors

10 µg eines gereinigten Plasmids wurden mit ein oder zwei Restriktionsenzymen gespalten, ethanolpräzipitiert und in 100 µl TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen. Um eine Religierung zu vermeiden, wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt (3.6.2.). Zur Kontrolle des Vektors bzw. der Phosphatase wurden 100 ng des Vektors ohne Fragment ligiert (3.6.6.) und in die Bakterientransformation (3.8.4.) eingesetzt. Der Vektor wurde verwendet, wenn die Zahl der Transformanten weniger als 1 Klon/µg DNA betrug bzw. weniger als 10% Klone wie bei Transformation von Vektor mit Fragment.

3.8.2. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Von E.coli HB 101/LM1035 wurde aus einer Einzelkolonie eine Übernachtskultur angelegt. 2 ml dieser Kultur wurden zu 500 ml autoklaviertem LB-Medium gegeben und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 angezüchtet. Nach Erreichen dieser Dichte wurden die Bakterien in einem Eisbad schnell auf 0°C abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 10 min, 5000 rpm, 4°C). Das Sediment wurde in 125 ml eiskalter MgCl₂-Lösung (0,1 M) suspendiert, erneut abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4°C) und erst in 25 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (0,1 M) aufgenommen und anschließend 225 ml 0,1 M CaCl₂ zugegeben. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde erneut abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4°C) und die Zellen in 5 ml 85% CaCl₂, 15% Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 200 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgefäße abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie zur längerfristigen Aufbewahrung in -80°C überführt wurden (Hanahan, 1983).

3.8.3. Transformation von Bakterien

5 µl eines Ligaseansatzes (20 µl) wurden zu 100 µl im Eis aufgetauter, kompetenter Bakterien zupipettiert, vorsichtig vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock von 5 min bei 37°C, bevor die Bakterien nach Zusatz von 2 ml LB-Medium 1-2 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert wurden. Jeweils 200 µl wurden auf Agarplatten (je nach Plasmidresistenz mit Ampicillin oder Tetracyclin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.9. Zellfusion

1×10^6 BHK-Zellen wurden mit 2×10^6 COS-1-Zellen auf einer 100 mm Zellkulturplatte ausgesät und 24 h in DME mit 5% FKS kokultiviert.

Zur Fusion wurden die Zellen zweimal mit warmem (37°C) DME gewaschen und anschließend mit 2 ml einer PEG-Lösung (50% PEG 1000 in DME; w:v) vorsichtig überschichtet. Nach exakt 1 min wurde die PEG-Lösung abgezogen und zweimal vorsichtig mit einer DMSO-Lösung (15% DMSO in DME) gewaschen. Verbleibendes DMSO wurde durch Nachwaschen mit DME (nur solange sich die Zellen nicht von der Platte ablösen) entfernt. Die Zellen wurden anschließend im CO₂-Brutschrank bei 37°C in DME mit 5% FKS inkubiert (Botchan et al., 1979).

Nach 48 h wurden die Zellen zur DNA-Präparation verwendet.

3.10. Transiente Expression des CAT-Gens

3.10.1 Transfektion von Zellen nach der Ca₃(PO₄)₂-Methode

Zur Transfektion wurden halbkongluente Gewebekulturschalen (100 mm) verwendet (die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion auf neue Platten verteilt). 3 h vor Beginn der Transfektion wurde das Medium abgezogen und 10 ml neues Medium (DME mit 10% FKS) pro Platte zugesetzt, um die Zellen in einen optimalen Wachstumszustand zu versetzen.

Für die Transfektion wurden DNA-Präzipitate von im allgemeinen 5-25 µg Plasmid-DNA hergestellt. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 500 µl die DNA, CaCl₂-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 250 mM und TE-Puffer pH 7,0 zusammenpipettiert und vermischt. Diese Lösung wurde unter heftigem Durchmischen auf einem Vortex langsam in 500 µl 2x HBS-Puffer (280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 50 mM Hepes; pH 7,13) eingetropfet. Der HBS-Puffer wurde vorher ausgetestet und der entstandene feine Niederschlag im Lichtmikroskop auf seine kristalline Struktur hin untersucht. Dieser sollte möglichst fein sein, um den Zellen die Aufnahme zu erleichtern.

Das Präzipitat wurde 15-30 min bei RT inkubiert, bevor es zu den Zellen gegeben wurde. Nach 3,5-5 h wurden die Zellen mit den auf ihnen haftenden Präzipitaten mikroskopisch überprüft und einem Glycerinschock unterworfen.

Dazu wurde das Medium abgesaugt und pro Platte 5 ml Glycerinlösung (20% Glycerin in 1x HBS-Puffer) zugegeben. Nach 2 min wurde die Glycerinlösung abgezogen, die Platten dreimal mit DME gewaschen, mit frischem Medium (DME mit 5% FKS) versehen und bei 37°C vermehrt (Pellicer et al., 1980; Graham and Van der Eb, 1973).

Nach ca. 44 h wurden die Proteinextrakte angefertigt (3.10.2.).

3.10.2. Präparation von Proteinextrakten

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen dreimal mit kalter (4°C) Hanks-Lösung gewaschen, mit je 1 ml TEN-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) versehen und mit einem Gummiwischer von der Platte abgeschabt. Die Zellen wurden durch Abzentrifugieren (Eppendorffzentrifuge, 2 min, 4°C) pelletiert, in 150 µl eiskaltem Tris/HCl pH 7,5 (0,25 M) aufgenommen und zum Aufbrechen der Zellwände zweimal je 3 sec beschallt, wobei die Zellen auf Eis gehalten wurden. Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 10 min, 4°C) wurde der proteinhaltige Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.10.3. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde mit Hilfe des Protein Assay Kits der Firma BioRad bestimmt. Bei Anwendung der Mikromethode, die eine Analyse im Bereich von 1-25 µg Protein/ml zuläßt, wurden 800 µl TE-Puffer mit 200 µl BioRad-Farbstofflösung und 2 µl Proteinextrakt in einer Plastik-Küvette vermischt und nach 5-10 min die Extinktion bei 595 nm gemessen. Anhand einer vorher erstellten Eichkurve mit 1-25 µg BSA konnte dann der Proteingehalt ermittelt werden (modifizierte Methode nach Bradford, 1976).

3.10.4. CAT-Aktivitätstest

Für den transienten Expressionstest wurden 200–250 µg Protein eingesetzt und mit Tris/HCL pH 7,5 (0,25 M) auf 150 ml aufgefüllt. Dazu wurden je 30 µl Acetyl-Coenzym A (4mM) und 2 µl ^{14}C -Chloramphenicol hinzupipettiert und die Reaktion 1 h bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde zweimal mit je 400 µl Ethylacetat extrahiert, wobei die organischen Phasen nach Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 2 min, RT) in ein neues Gefäß überführt und vereinigt wurden. Zur Entfernung des Ethylacetats wurden die Proben im Vakuum getrocknet und anschließend in 30 µl Ethylacetat aufgenommen. Die Proben wurden dann punktförmig auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen. Die Chromatographie wurde in abgeschlossenen Kammern ca. 1,5 h durchgeführt, wobei als Laufmittel ein Gemisch von Chloroform und Methanol (95:5) diente. Nach dem Lauf wurden die Chromatogramme getrocknet und 12–16 h exponiert (Kodak X-Omat XAR 5).

3.11. Konstruktion einer genomischen DNA-Bank in λ -Phagen

3.11.1. Präparation von λ -Vektorarmen

Es wurde der Phage EMBL 3A⁺ verwendet, dessen Mittelteil durch die Polylinker-Schnittstellen Sal I, Bam HI, Eco RI auf der einen Seite bzw. reziprok Eco RI, Bam HI, Sal I auf der anderen Seite begrenzt wurde.

Durch einen Doppelverdau der gemäß 3.4.5. erhaltenen Phagen-DNA mit Bam HI und Eco RI und anschließender Fällung mit Isopropanol wurde eine Trennung der Phagenarme vom Mittelteil erreicht, welches mit diesen nicht mehr rückligieren kann.

Die Arme wurden gemäß 3.7.1. aus einem Agarosegel isoliert und gereinigt. Eine Kontroll-Ligation, bei der die präparierten Arme ligiert (3.6.6.) und in eine Infektionskultur eingebracht wurden (3.3.2.), ergab weniger als 1% infektiöse Phagenpartikel (d.h. Verunreinigung der Phagenarme mit Mittelstücken).

3.11.2. Präparation zellulärer DNA-Fragmente eines bestimmten Größenbereiches

Um die Bedingungen für einen partiellen Restriktionsverdau zu testen, wurde je 1 µg zelluläre DNA mit abnehmenden Enzymkonzentrationen von 2-0,05 units Mbo I/µg DNA geschnitten und die Enzymkonzentration ausgewählt, bei der die meisten DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 15-20 kb vorlagen. Unter den gewählten Bedingungen wurden dann für einen präparativen Ansatz 500 µg zelluläre DNA mit Mbo I geschnitten und mit Phenol und CIA extrahiert.

Die Isolierung der DNA-Fragmente im Größenbereich von 12-20 kb erfolgte in einem CsCl-Gradienten. Ein kontinuierlicher Gradient wurde in einem Gradientenmischer aus 5,4 ml CsCl-Lösung der Dichte 1,500 (8,5 g CsCl, 10,125 ml H₂O, 125 µl TE-Puffer) und 5,7 ml CsCl-Lösung der Dichte 1,326 (5,525 g CsCl, 10,875 ml H₂O, 125 µl TE-Puffer) hergestellt.

Auf diesen Gradienten wurde die DNA in einem Volumen von 200 µl aufgetragen und in einem Sorvall TST 41.14-Ausschwingrotor 14 h bei 25000 rpm und 20°C zentrifugiert. Danach wurde der Gradient in 500 µl Fraktionen aufgefangen und Aliquots für die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Fraktionen, die DNA-Fragmente gewünschter Größe enthielten, wurden vereinigt, zweimal gefällt und zur Abspaltung der Phosphatreste mit alkalischer Phosphatase behandelt (3.6.2.).

Anschließend wurde die DNA wiederum gereinigt und gefällt und in einer Konzentration von 0,5 µg/µl in TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen.

3.11.3. Herstellung von Verpackungsextrakten für λ-Phagen-DNA

Vor der Präparation wurde die Verwendbarkeit der Bakterienstämme BHB 2690 und BHB 2688 getestet. Dazu wurde von jedem Stamm eine Einzelkolonie auf je zwei Platten ausgestrichen, von denen eine bei 32°C und die andere bei 42°C inkubiert wurde. Nur auf den bei 32°C inkubierten Platten sollten Kolonien wachsen, während das Wachstum bei 42°C durch induzierte Lysis verhindert worden sein sollte.

"Sonicated Extract" (SE):

500 ml NZCY-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von BHB 2690 so angeimpft, daß eine OD_{600} von 0,08-0,1 erreicht wurde. Die Suspension wurde bei 32°C geschüttelt, bis zu einer OD_{600} von 0,3, dann wurde bei 45°C in einem Wasserbad unter leichtem Schütteln 15 min induziert. Unter starkem Schütteln wurden die Bakterien weitere 3 h bei 37°C inkubiert.

Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 10 min, 5000 rpm, 4°C) und das Pellet in 3,6 ml Beschallungspuffer (1 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoethanol, 3 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris/HCl pH 8,0) aufgenommen. Die Zellen wurden dann in einem Eisbad 20 x je 3 sec ultraschallbehandelt, bis die Lösung klar wurde. Die Zelltrümmer wurden dann abzentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 10 min, 10000 rpm, 4°C) und zu dem Überstand 3 ml eiskalten Beschallungspuffer und 500 μ l Packagingpuffer (30 mM ATP, 30 mM β -Mercaptoethanol, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM Putrescin, 50 mM Spermidin, 6 mM Tris/HCl pH 8,0) hinzugegeben.

Die Lösung wurde in 100 μ l Aliquots in bei -80°C vorgekühlte 0,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde der Extrakt bei -80°C eingefroren.

"Freeze-Thaw-Lysate" (FTL):

3 x 500 ml NZCY-Medium wurden mit einer Übernachtskultur des Bakterienstammes BHB 2688 so angeimpft, daß eine OD_{600} von 0,08-0,1 erreicht wurde. Unter Schütteln wurde bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,3 bei 32°C inkubiert. Die Induktion erfolgte bei 45°C unter leichtem Schütteln im Wasserbad. Danach wurde weitere 3 h bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden in einem Sorvall GSA-Rotor 10 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert und in 3 ml kalter Sucrose-Lösung (10 % Sucrose, 50 mM Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert. Die Lösung wurde auf 6 bei -80°C vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt, jeweils 25 μ l Lysozym-Lösung (2 mg/ml in 0,25 mM Tris/HCl pH 7,5) hinzupipettiert, vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Suspension wurde auf Eis wieder aufgetaut, jeweils 25 μ l Packagingpuffer hinzugefügt und vermischt. Es wurde erneut abzentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 1 h, 20000 rpm, 4°C), die Überstände vereinigt und in bei -80°C vorgekühlte Eppendorfgefäße in 75 μ l Aliquots abgefüllt. Die Portionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.11.4. *In vitro* Verpackung von Phagen-DNA

Je ein Aliquot der beiden Verpackungsextrakte wurde auf Eis unvollständig aufgetaut. Zu 10 μ l FTL wurde maximal 1 μ g DNA in einem Volumen von höchstens 2 μ l dazupipettiert, leicht gemischt, sofort 15 μ l SE hinzugegeben, nochmals leicht gemischt und bei RT 1-2 h inkubiert.

Der Mix konnte danach wie eine Phagenstocklösung (3.3.2.) behandelt werden. Vor der Titerbestimmung wurden 274 μ l SM-Medium zugefügt und von 10 μ l der Titer bestimmt (Hohn, 1979).

3.11.5. Verknüpfung von λ -Armen mit zellulären DNA-Fragmenten

Zu 10 μ l λ -Phagenarmen (= 10 μ g) und 5 μ l zellulärer DNA (= 2,5 μ g) wurden 4 μ l 5x Ligasepuffer (3.6.6.) und 2 units T4 DNA-Ligase gegeben (Gesamtvolumen 20 μ l und 48 h bei 16°C inkubiert. Zur Kontrolle der Vektorspaltung wurde der Vektor ohne zelluläre DNA - deren Volumen wurde durch H₂O ersetzt - ligiert (3.11.1.).

Die Effizienz der Ligation wurde durch Gelelektrophorese überprüft.

Nach Beendigung der Ligierung wurden 1,5 μ l des Ligationsansatzes und der Kontrollligierung mit einem "*in vitro* -packaging- mix" verpackt (3.11.4.).

Nach Bestimmung des Titers wurden weitere Aliquots verpackt, bis mindestens 1×10^6 rekombinante Klone zu erwarten waren. Diese Zahl reicht statistisch aus, um ein bestimmtes DNA-Fragment in einer Hamster-Genbank mit 99% Wahrscheinlichkeit wiederzufinden.

3.11.6. Amplifikation von Genbanken

1×10^6 der aus den Ligationsansätzen erhaltenen Klone wurden zur Amplifikation verwendet. Dies ist dann notwendig, wenn die Genbank öfter nach bestimmten Klonen abgesucht werden soll.

Es wurden 20x200 μ l einer Infektionskultur von E. coli K803 (3.3.1.) mit je 5×10^4 pfu des Verpackungsmixes infiziert und mit je 7 ml Topagarose auf 140 mm NZCY-Platten ausplattiert (3.3.2.). Die Platten wurden 8 h bei 37°C inkubiert, bis die Phagenplaques sich gerade erst berührten, um eine Doppelinfektion und ein damit verbundenes mögliches Rekombinationsereignis, welches eine falsche Situation in der genomischen DNA vorspiegeln würde, zu vermeiden.

Danach wurde jede Platte mit 12 ml SM-Medium versetzt und 12-24 h bei 4°C inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, vereinigt und die Platten nochmal mit je 4 ml SM-Medium nachgespült. Das gesammelte phagenhaltige Medium wurde vereinigt, mit 1% Chloroform versetzt und vermischt.

Von einem Aliquot wurde der Titer bestimmt, der Rest wurde bei -80°C eingefroren bzw. bei 4°C aufbewahrt.

3.11.7. Plaquehybridisierung

Mindestens 5×10^5 pfu wurden verwendet, um die Genbank auf bestimmte Klone hin durchzumustern.

Je 5×10^4 pfu wurden zur Infektion von je 200 µl einer Infektionskultur verwendet und auf 140 mm NZCY-Platten ausplattiert.

Für Filterabzüge von Phagenplatten wurden Nitrocellulosefilter am Rand markiert und auf die Platten gelegt, die vorher mindestens 4 h bei 4°C gestanden haben sollten. Es wurde darauf geachtet, daß keine Luftblasen zwischen Platte und Filter eingeschlossen waren. Die Lage des Filters wurde mit einer Nadel, die durch den Filter und den Agar gestochen wurde, markiert, ebenso die Einstichstellen auf dem Boden der Platte.

Nach 2 min wurde der Filter von der Platte abgezogen und 2 min in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) gelegt. Anschließend wurde der Filter für 2 min in Neutralisationspuffer (0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 0,9 M NaCl; pH 5,5) gelegt und danach in 2x SSC äquilibriert. Der Filter wurde auf 3MM Whatman Papier getrocknet, 2 h bei 80°C gebacken und für die Hybridisierung verwendet.

3.11.8. Plaquereinigung von Phagen

Phagenplaques, deren DNAs bei der Hybridisierung ein positives Signal ergaben, wurden mit einer Pasteurpipette aus der Agarplatte ausgestochen, in 400-500 µl SM-Medium gegeben und mindestens 4 h bei 4°C aufbewahrt. Von dieser Phagensuspension wurden mehrere Verdünnungsstufen mit Infektionskulturen inkubiert, auf NZCY-Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Von Platten, auf denen maximal 10^2 Plaques entstanden waren, wurden Filterabzüge angefertigt und erneut hybridisiert. Dieses Verfahren wurde 3-4 Mal angewendet, bis auf einer Platte nur noch Plaques zu finden waren, deren DNA ein positives Signal bei der Hybridisierung ergaben und die somit eine homogene Nachkommenschaft eines Ausgangsphagen darstellten. Die DNA dieser Phagen konnte dann durch Schnellaufschlüsse (3.4.4.) charakterisiert werden.

3.12. Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde nach dem Dideoxyverfahren an doppelsträngiger DNA durchgeführt (Wallace et al., 1981; Chen & Seeburg, 1985).

3.12.1. Isolierung der Plasmid-DNA für Sequenzreaktionen

5 ml einer entsprechenden Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (5 min, 7000 rpm, 4°C), das Pellet in 2,5 ml eiskaltem TEN-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl Lysozymlösung (10 mg Lysozym/ml, 10 mM Tris/HCl pH 8,0) aufgenommen, 5 min bei RT inkubiert, mit 200 µl SDS-Lösung (1% SDS in 0,2 M NaOH) versetzt, auf Eis gestellt und sofort mit 150 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 versehen 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 15 min in einer Eppendorfsentrifuge bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 2 Vol Ethanol gefällt, abzentrifugiert, getrocknet, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und mit 5 µl RNase A (5 mg/ml) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden 40 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 260 µl TE-Puffer zupipettiert und mit 400 µl Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Die obere Phase wurde mit 1 ml Ethanol gefällt, abzentrifugiert, gewaschen, getrocknet und in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

3 µl der DNA wurden auf einem 1%igen Agarosegel zur Überprüfung der Reinheit und der Ausbeute aufgetrennt.

3.12.2. Sequenzreaktion

Die Sequenzierung wurde mit dem "Sequenase Kit" von USB durchgeführt.

1 µg der aus 3.12.1. gewonnenen Plasmid-DNA wurde mit 8 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH, 0,2 M EDTA) versetzt und mit H₂O auf 40 µl aufgefüllt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden 4 µl Neutralisationslösung (2 M Ammoniumacetat pH 4,5) und 100 µl Ethanol zugegeben und die DNA 30 min bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation (Eppendorfsentrifuge, 15 min, 4°C) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 7 µl TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen.

Dazu wurden 2 µl 5x Sequenase-Puffer und 1 µl des reversen Primers (1,25 pmol/µl, verdünnt 1:1) pipettiert und das Reaktionsgefäß 2 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Für die "Annealing"-Reaktion wurde das Reaktionsgefäß in ein Becherglas mit 65°C warmem H₂O überführt und dieses bei RT 30-45 min auf ca. 30°C abgekühlt.

Danach wurden zupipettiert:

1 μ l DTT (0,1 M)

2 μ l Labelling Mix (1:4 in H_2O verdünnt; dCTP, dGTP, dTTP)

1 μ l α - ^{35}S -dATP

2 μ l Sequenase-Enzym (1:7 in eiskaltem TE-Puffer pH 7,5 verdünnt)

Die Lösung wurde mit der Pipettenspitze gemischt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Von dieser Mischung wurden dann je 3,5 μ l zu den vorbereiteten 4 ddNTPs (je 2,5 μ l pro Reaktionsansatz, auf 37°C kurz vor Gebrauch erwärmt) zupipettiert, mit der Pipettenspitze gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 μ l Stoppuffer beendet und bis zum Auftragen auf das Gel bei -20°C eingefroren.

Sequenz des reversen Primers für pUC-Plasmide:

5'-AACAGCTATGACCATG-3'

3.12.3. Elektrophorese von Sequenzgelen

Für die Auftrennung der Sequenzreaktionsprodukte wurden 5%ige, keilförmige (0,1-0,4 mm oder 0,2-0,4 mm) Polyacrylamidgele (8 M Harnstoff) verwendet. Der Vorteil von Keilgelen liegt darin, daß durch die in Laufrichtung abnehmende Stromdichte die Banden näher zusammengeschoben werden, so daß mehr Banden gelesen werden können.

Die Glasplatten wurden mit SDS (2%), NaOH (0,2 M) und H_2O gereinigt.

Auf der Haftplatte wurde Bindsilanlösung (18 μ l γ -Methacryloxypropyl-trimethoxysilan, 185 μ l 10% Essigsäure, 5 ml Ethanol abs.) verteilt, 5 min trocknen gelassen und poliert. Anschließend wurde dreimal mit Ethanol nachgewaschen und erneut poliert.

Die Themostatplatte wurde zweimal mit Silikonlösung behandelt (jeweils trocknen gelassen und poliert) zweimal mit Ethanol nachgewaschen und wieder poliert. Durch die Behandlung wurde erreicht, daß das Gel nach der Elektrophorese auf der Haftplatte verblieb.

Verschieden lange, 0,1 mm dicke Spacer wurden in der Weise angelegt, daß ein nach unten zunehmender Keil entstand. Das Gel wurde in horizontaler Lage gegossen, die Polymerisationszeit betrug mindestens 1,5 h.

Nach Ausspülen der Taschen und einer Vorelektrophorese (2000 V, ca. 25 mA, 30 min) wurde je 1 μ l der Proben (2 min auf 100°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt) mit einer Mikrokanüle aufgetragen und die Elektrophorese bei 2000 V, 30 mA und einer Temperatur von 65°C durchgeführt. Nach Beendigung des Gellaufs (2-2,5 h) wurde die Haftplatte mit dem Gel zur Entfernung des Harnstoffs zweimal 30 min bei RT in 10% Essigsäure geschwenkt, mit destilliertem H₂O gespült und bei 80°C 2 h getrocknet.

Danach wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat XAR 5) direkt auf das Gel gelegt und bei RT ca. 2 Tage exponiert.

Laufpuffer (10x TBE): 1 M Tris, 830 mM Borat, 10 mM EDTA

Acrylamidlösung (5%): 40 g Harnstoff, 8 ml 10x TBE, 12 ml einer 40% Polyacrylamidstammlösung, ad 80 ml H₂O

Polyacrylamidstammlösung: 95 g Acrylamid, 5 g N,N'-Methylenbisacrylamid, ad 250 ml H₂O

Die Acrylamidlösung wurde filtriert und kurz vor dem Gießen wurden 275 μ l APS (Ammoniumpersulfatlösung 10%) und 23 μ l TEMED zugegeben.

4. ERGEBNISSE

4.1. Promotorbereiche von pSV0, pSV2 und pdSV8

Wie in dem eingangs dargestellten Selektionsschema (Abb. 1b) gezeigt wurde, sollte ein im Promotorbereich defektes Resistenzplasmid zur Expressionsselektion eingesetzt werden.

Es wurde hierzu der Bereich der Regulationselemente der frühen Gene von Simian Virus 40 (SV40) verwendet.

Der Promotorbereich des Wildtyps ist in Abb. 2a dargestellt und umfaßt folgende Elemente:

Im Bereich von Position 5175 (Hind III-Schnittstelle) bis Position 40 (Koordinaten nach dem BBB-System, Tooze, 1981) liegen die T-Antigen-Bindungsstellen I und II, die Sequenzen des "minimal origin of replication" (Subramanian & Shenk, 1978; Deb et al., 1986), die TATA-Box, sowie die Startstellen für die frühen Transkripte E_E und E_L (Rio et al., 1980). Es folgen von Position 41 bis 105 die 21 bp Repetitionen (2x 21 bp, 1x 22 bp) mit den sechs Sp1-Bindungsstellen GGGCGG (Dyran & Tjian, 1983) sowie im Bereich von Position 107 bis 251 die beiden 72 bp Repetitionen, die den SV40 Enhancer bilden (Banerji et al., 1981; Fromm & Berg, 1982).

Abb. 2b zeigt den defekten Promotorbereich des verwendeten Plasmids pdSV8, das von Frau Fanning, München, zur Verfügung gestellt wurde.

Der Bereich von 5175 bis 40 entspricht den oben beschriebenen Wildtyp-Sequenzen, ebenso sind die ersten beiden der drei 21 bp Repetitionen unverändert. Die dritte 21 bp Repetition ist ab Position 91 deletiert und durch einen Bereich vom 5'-Ende des Enhancers (Pos. 161 - 178) ersetzt. Daran schließt sich ein 22 bp langes Fragment an, welches das 3'-Ende des Enhancers von Pos. 107 bis zur Sph I-Schnittstelle bei Pos. 128 umfaßt.

Im Plasmid pdSV8 war dieser defekte Promotorbereich auf einem Hind III/Sph I-Fragment in pBR 322 (Hind III/Sph I) kloniert worden (siehe Abb. 3c).

In dem ebenfalls verwendeten Kontroll-Plasmid pSV0 ist kein eukaryotischer Promotor mehr vorhanden. Er wurde über einen Acc I/Hind III-Schnitt und anschließender Ligierung über Hind III-Linker entfernt (Gorman, 1982; siehe Abb. 3b).

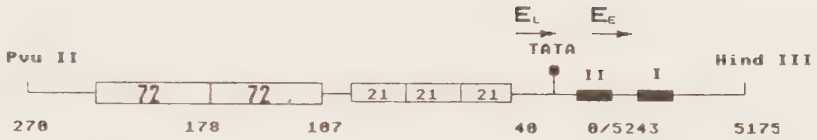
pSV2 wt

Abb. 2a: Promotorbereich der frühen Gene des SV40-Wildtyps
(Erläuterungen im Text)

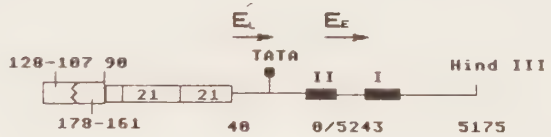
pdSV8

Abb. 2b: Defekter SV40-Promotor in pdSV8
(Erläuterungen im Text)

Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf wt-Positionen; die Länge des Promotors von der Hind III-Schnittstelle zur Sph I-Schnittstelle beträgt 198 bp.

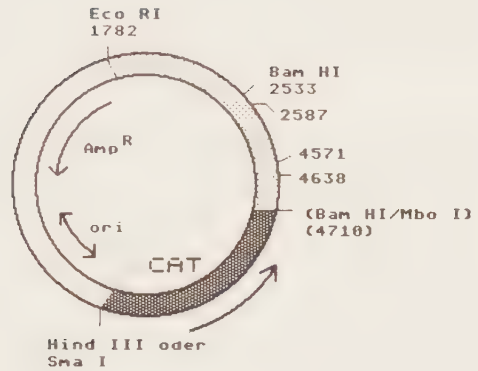
pSV0CAT

Abb. 3b: Struktur des Vektors pSV0CAT (Gorman, 1982)

pBR 322-Anteile sind als offene Balken, SV40-DNA hell gesandet und das CAT-Gen dunkel gesandet dargestellt. Die angegebenen Zahlen entsprechen SV40-Koordinaten.

Zur Klonierung von pdSV8CAT wurden folgende Fragmente ligiert:

Sma I/Bam HI-Fragment aus pSV0CATSma (bakterieller Anteil und SV40-Anteil; 2,8kb)

Bam HI/Hind III-Fragment aus pSV0CATHind (SV40-Anteil und CAT-Gen; 1,7 kb)

Nru I/Hind III-Fragment aus pdSV8 (defekter Promotor; 0,6 kb)

Nru I schneidet mit glatten Enden 410 bp von der Sph I-Schnittstelle entfernt im pBR322-Anteil von pdSV8 (Abb. 3c) und ließ sich so mit den ebenfalls glatt geschnittenen Sma I-Enden ligieren.

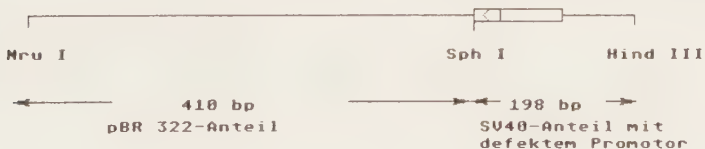


Abb. 3c: Struktur des Nru I/Hind III-Fragments von pdSV8 in pBR 322

Mit dem Ligationsansatz wurden Bakterien transformiert. Die getesteten Ampicillin-resistenten Klone enthielten alle das richtige Plasmid, was durch Restriktionsanalyse überprüft wurde.

4.3. CAT-Aktivitätstest von pSV0CAT, pSV2CAT und pdSV8CAT

In CAT-Aktivitätstests läßt sich die Stärke eines eukaryotischen Promotors messen. Je aktiver der vorgeschaltete Promotor, desto häufiger wird das CAT-Gen transkribiert und damit das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase gebildet. Dieses bewirkt, daß bei Zugabe von Acetyl-Coenzym A und Chloramphenicol acetylierte Produkte entstehen, die auf Grund ihrer unterschiedlichen Laufeigenschaften chromatographisch aufgetrennt werden können und deren Menge mit der Promotorstärke korreliert ist.

Für die Durchführung von CAT-Enzymtests wurden BHK-Zellen mit steigenden Mengen Plasmid-DNA transfiziert, nach 48 h Proteinextrakte gewonnen und diese mit ^{14}C -Chloramphenicol und Acetyl-Coenzym A inkubiert (3.10.1. - 3.10.4.).

Die acetylierten Produkte wurden anschließend chromatographisch aufgetrennt und autoradiographiert.

Das Ergebnis ist in Abb. 4a dargestellt.

Es wurden je 5 µg, 10 µg und 15 µg pdSV8CAT-, pSV2CAT- und pSV0CAT-DNA transfiziert. Der Wert bei 15 µg pSV2CAT DNA wurde auf 100 % Aktivität gesetzt, da bei dieser Menge an DNA die Aktivitätskurve noch nicht in einem Sättigungsbereich angelangt war.

Die Radioaktivitätsmessungen der acetylierten Produkte in einem Berthold Scintillationszähler ergaben, daß bei 15 µg transfizierter DNA pSV0CAT eine Restaktivität von 7% und pdSV8 CAT eine Aktivität von 14% gegenüber 100% Wildtypaktivität bei pSV2CAT aufwiesen (Abb. 4b).

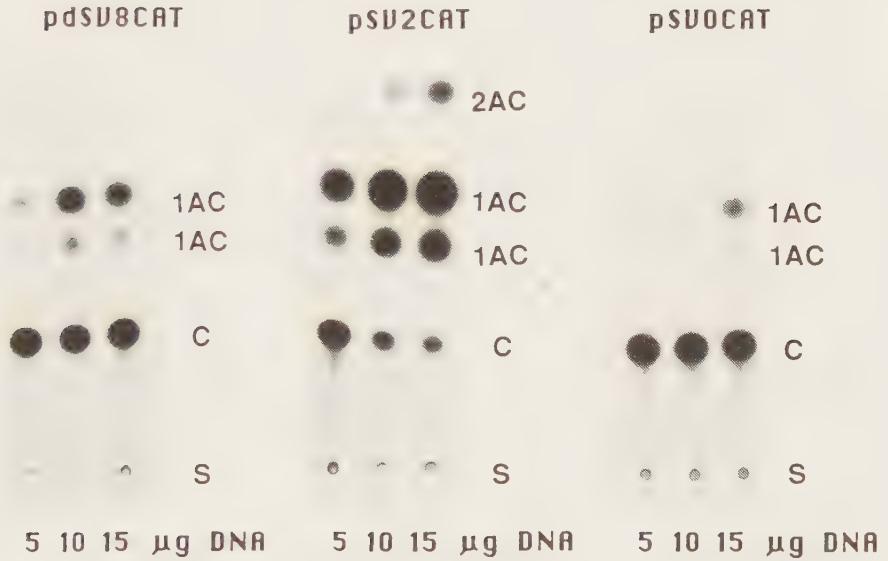


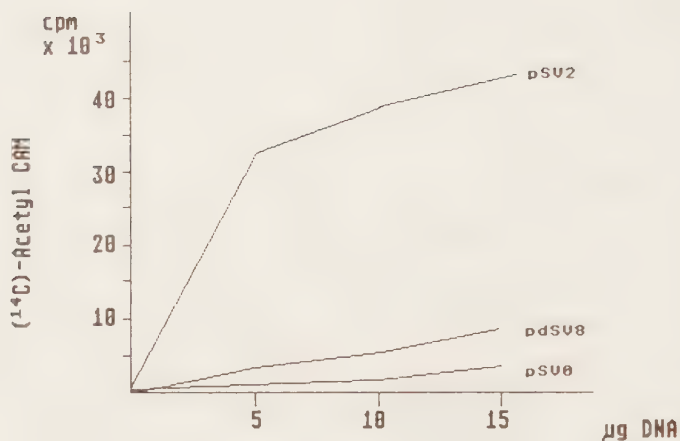
Abb. 4a: CAT-Aktivitätstest von pSV0CAT, pSV2CAT und pdSV8CAT
BHK-Zellen wurden mit 5, 10 und 15 µg der jeweiligen Plasmide transfiziert.
Die Proteinextrakte (250 µg) wurden mit ^{14}C -Chloramphenicol und Acetyl-Co-
enzym A inkubiert (1 h) und die acetylierten Produkte chromatographisch auf-
getrennt.

S: Auftrags- und Startstelle

C: nicht acetylierte Form des Chloramphenicol

1 AC: acetylierte Formen des Chloramphenicol mit einer Acylgruppe

2 AC: acetylierte Form des Chloramphenicol mit zwei Acylgruppen



Plasmid		cts (t = 10 min)	% Aktivität
pSV2	15 µg	428580	100% (festgelegt)
pSV0	15 µg	32228	7%
pdSV8	15 µg	60962	14%

Abb. 4b: Radioaktivitätsmessungen der acetylierten Formen des Chloramphenicols (siehe Abb. 4a).

Aufgetragen sind die Zerfälle pro Minute (y-Achse) gegen die transfizierte Menge DNA der jeweiligen Plasmide (x-Achse).

Die Länge der Zählzeit betrug 10 min.

Hiermit konnte gezeigt werden, daß die Deletionen im Enhancerbereich von pdSV8 eine deutliche Minderung der Promotoraktivität bewirkten und sich dieses Plasmid somit für die Expressionsselektion verwenden ließ.

4.4. Klonierung des Promotors von pdSV8 vor das neo-Gen

Chloramphenicol ist toxisch für eukaryotische Zellen. Die Expression des CAT-Gens führt zwar zur Resistenz eukaryotischer Zellen gegenüber Chloramphenicol und könnte somit auch zur Selektion verwendet werden, jedoch treten häufig Spontanresistenzen auf. Dies konnte gezeigt werden durch die Transfektion von BHK-Zellen mit pdSV8CAT und pSV0CAT. Es traten eine Anzahl resistenter Zellklone auf, von denen jedoch keiner eine Integration des Selektionsplasmids aufwies (Nachweis durch Southern Blots) und die somit alle auf spontane Resistenzbildung zurückzuführen waren.

Da die Chloramphenicolresistenz somit als Selektionssystem für die Expressionsselektion ungeeignet war, wurden Plasmide mit Neomycin-Resistenzen verwendet. Das hierfür verantwortliche neo-Gen stammte ursprünglich aus dem bakteriellen Transposon Tn 5 (Davies & Smith, 1978) und wurde über pBR 322 auch in pSV2 bzw. pSV0 kloniert (Southern & Berg, 1982). Das Gen kodiert für eine Aminoglycosid-3'-Phospho-Transferase-Aktivität, durch die z.B. das Aminoglycosid-Antibiotikum Geneticin (G418) inaktiviert werden kann. Eine ausreichende Expression des neo-Gens verleiht vielen eukaryotischen Zellen Antibiotikaresistenz, auf die als dominanter, stabiler Marker leicht selektioniert werden kann (Colbère-Garapin et al., 1981).

pdSV8neo wurde konstruiert, indem das Hind III/Bam HI-CAT-Fragment aus pdSV8CAT durch ein Hind III/Bam HI neo-Fragment aus pSV2neo ersetzt wurde.

4.5. Transfektion von BHK-Zellen mit pSV0neo, pSV2neo und pdSV8neo (1. Transfektionsrunde)

Halbkongfluente BHK-Zellen (20 Petrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm) wurden mit je 50 ng pdSV8neo-Plasmid-DNA und 10 µg ultraschallbehandelter genomischer BHK-DNA (Fragmentgrößen unter 100 bp; es wurde 30 min beschallt und die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch von eventuell verbliebenen größeren Fragmenten abgetrennt) als Träger-DNA transfiziert.

Die Hälfte dieser Platten (10) wurden mit einem pdSV8neo-Plasmid transfiziert, welches vorher durch Restriktionsverdau mit Sph I linearisiert worden war. Hierdurch sollte eine eventuelle Erleichterung der Integration in die chromosomale DNA durch eine bereits vorhandene Öffnung des Plasmids ausgenutzt werden, bzw. durch die Öffnung unmittelbar am 5'-Ende der Promotorsequenzen sollte nach erfolgter Integration der Plasmidanteil zwischen Promotor und angrenzender zellulärer DNA möglichst klein gehalten werden.

pSV2neo (2 Platten) und pSV0neo (4 Platten) wurden zur Kontrolle in gleicher Menge ebenfalls transfiziert. Von pSV2neo wurde 1 Platte mit linearisierter DNA transfiziert, von pSV0neo 2 Platten (linearisiert mit Hind III).

Wiederum jeweils die Hälfte der Platten (je 5 bei pSV8neo, 2 bei pSV0neo) wurden 24 h nach der Transfektion für weitere 24 h mit 5-Azacytidin (30 μ M) behandelt.

Azacytidin ist ein Cytidinanalog, das an der Position 5 ein Stickstoffatom an Stelle eines Kohlenstoffatoms trägt und somit nicht methyliert, aber in neu synthetisierte DNA eingebaut werden kann. Auch können mit Hilfe von 5-Azacytidin bereits methylierte Bereiche auf der DNA demethyliert werden (Jones et al., 1982).

Da eukaryotische Gene häufig durch Methylierung der regulatorischen Sequenzen inaktiviert sind (Doerfler, 1983), lassen sich solche Bereiche durch Expressionsselektion nicht erfassen. Der Gedanke war somit, auch Regulationselemente, die im Normalfall durch Methylierung abgeschaltet sind, durch eine Demethylierung zu aktivieren und dadurch im Falle einer benachbarten Integration des Selektionsplasmids und Expression des neo-Gens isolieren zu können.

Die Platten wurden 48 h nach der Transfektion mit 600 μ g/ml G418 versehen. Die zum Absterben der BHK-Zellen optimale Konzentration war vorher ausgetestet worden. Nach 15 Tagen waren bei einer Konzentration von 600 μ g/ml keine lebenden BHK-Zellen mehr zu finden, bei einer Konzentration von 400 μ g/ml dagegen traten noch einzelne überlebensfähige Klone auf.

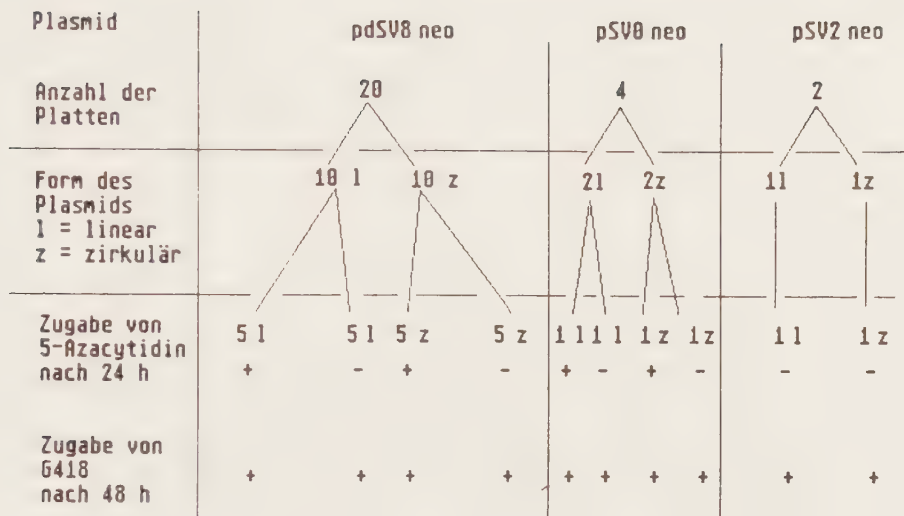


Abb. 5: Transfektionsschema

Nach 4 - 6 Wochen waren bei den mit pdSV8neo und pSV0neo transfizierten Zellen erste Zellklone zu erkennen (bei pSV2neo waren bereits nach 3 Wochen Zellklone zu finden), die nach Erreichen von ca. 1 mm Durchmesser isoliert und auf Mikrotiterplatten vereinzelt wurden.

Es wurden von den mit pdSV8neo transfizierten Zellen 86 Klone vereinzelt, von den mit pSV0neo transfizierten 10 Klone, und aus der Transfektion mit pSV2 neo wurden 6 Kontrollklone isoliert.

In der Anzahl resistenter Zellklone war kein Unterschied festzustellen zwischen Zellen, die mit linearem oder zirkulärem Plasmid transfiziert wurden. Auch die Zugabe von Azacytidin zeigte keine Auswirkungen auf den Erhalt G418-resistenter Zellklone. Daraus konnte man schließen, daß - vorausgesetzt die Demethylierung durch Azacytidin war erfolgreich verlaufen - die Anzahl der reaktivierten Regulationselemente nicht so hoch sein konnte, als daß sich dadurch eine signifikante Erhöhung der Anzahl resistenter Zellklone ergeben hätte.

Ausbeute an Zellen mit resistantem Phänotyp:

pdSV8neo: pro Platte ca. 10^7 Zellen x 20 Platten = 2×10^8
ca. 125 resistente Klone ergeben eine Effizienz von 1.6×10^{-6}

pSV0neo: pro Platte ca. 10^7 Zellen x 4 Platten = 4×10^7
11 resistente Klone ergeben eine Effizienz von 3.6×10^{-6}

pSV2neo: pro Platte ca. 10^7 Zellen x 2 Platten = 2×10^7
keine Einzelklone erkennbar; pro Platte ca. 150 - 200 Klone;
Effizienz etwa $5 - 6 \times 10^{-4}$

Aus dem Auftreten von G418 resistenten Zellklonen wurde folgender Schluß gezogen:

Das Überleben einer mit G418 behandelten Zelle war nur möglich, wenn das Antibiotikum abgebaut wurde, was wiederum nur durch eine effiziente Transkription und Expression des neo-Gens bewirkt werden konnte.

Der defekte Promotor in pdSV8neo wies aber nur eine sehr geringe Transkriptionsaktivität auf, wie durch die CAT-Aktivitätstests gezeigt werden konnte, und was sich auch in der deutlich geringeren Anzahl resistenter Klone im Vergleich zu Zellen, die mit pSV2neo transfiziert wurden, widerspiegelte.

Somit wurde postuliert, daß in mit pdSV8neo transfizierten resistenten Zellklonen das Selektionsplasmid in das Genom einzelner Hamsterzellen integriert wurde, und zwar in der Nähe eines transkriptionsaktivierenden Bereiches.

Diese Aktivatorsequenz aus dem Hamstergenom war dann in der Lage, den Defekt des unvollständigen Promotors von pdSV8neo zu kompensieren, was eine genügende Transkription des neo-Gens und damit eine Resistenz gegenüber G418 zur Folge hatte.

Resistente Zellklone aus mit pSV0neo transfizierten Zellen waren wahrscheinlich dadurch entstanden, daß ein vollständiger zellulärer Promotorbereich die Transkription des neo-Gens übernommen hatte.

4.5.1. Southern Blot Analyse resistenter Zellklone aus der 1. Transfektionsrunde

Ein Teil der auf Mikrotiterplatten vereinzelter Zellklone wurde auf 140 mm Petrischalen verteilt und kultiviert. Von fast konfluenten Zellen wurde dann genomische DNA präpariert (3.4.1.) und analysiert, um über die Integration des neo-Plasmids in das Genom der einzelnen Klone Aufschluß zu erhalten.

Hierzu wurden jeweils 10 μ g DNA einzelner resistenter Zellklone mit Bam HI geschnitten und nach Auftrennung der DNA über ein Agarosegel (1%) auf einen Nitrocellulosefilter transferiert. Der Filter wurde mit einer 32 P-markierten pdSV8neo-Probe hybridisiert und die Autoradiographie ergab das in Abb. 6 dargestellte Hybridisierungsmuster.

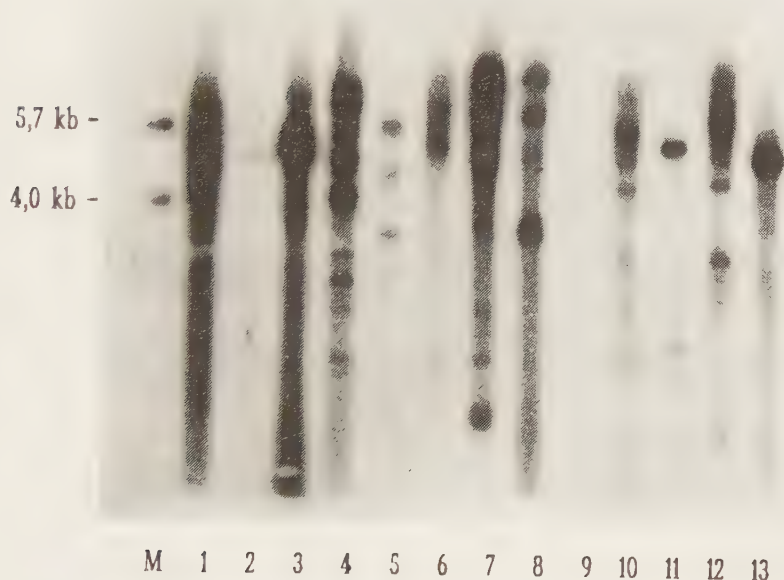


Abb. 6: Southern Blot Analyse resistenter Zellklone der 1. Transfektionsrunde
M: Größenmarker (pdSV8neo, geschnitten mit Bam HI ergibt eine Linearisierung des Plasmids mit 5,7 kb; ein Verdau mit Bam HI/Hind III ergibt zwei Banden von 4,0 kb und 1,7 kb, wobei letztere das CAT-Gen enthält und somit bei der Hybridisierung mit pdSV8neo nicht auftaucht).

1-13: Bam HI-geschnittene genomische DNA (10 μ g; nur je 2 μ g in den Spuren 2 und 9) von 13 verschiedenen resistenten Klone der 1. Transfektionsrunde wurde auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter transferiert und hybridisiert.

Spuren 2-6, 8-12: DNA pdSV8neo-transfizierter Klone

Spuren 1, 7, 13: DNA pSV0neo-transfizierter Klone

Hybridisierungsprobe: 32 P-markiertes pdSV8neo

In den genomischen DNAs aller getesteten Klone waren multiple Insertionen von pdSV8neo zu beobachten. In einigen Fällen schienen Insertionen in relativ hohen Kopienzahlen vorzuliegen (Abb. 6 z.B. Spuren 1, 3, 4, 7, 12), in anderen Fällen waren nur wenige Plasmide eingebaut worden (Abb. 6 z.B. Spuren 5, 11), jedoch stets mehr als eine Kopie.

Da Bam HI eine Schnittstelle in pdSV8neo besitzt, wären bei einer Einzelkopie-Insertion des Plasmids zwei schwache Banden zu erwarten gewesen, die sich aus Plasmid- und zellulärem Anteil zusammensetzen.

In den Spuren 2 und 9 betrug die aufgetragene Menge nur jeweils 2 µg. Bei einer längeren Exposition des Films konnten auch bei diesen Klonen multiple Insertionen festgestellt werden (ohne Abb.).

4.5.2. Northern Blot Analyse resistenter Zellklone aus der 1. Transfektionsrunde

Von den einzelnen resistenten Zellklonen wurde ebenfalls RNA präpariert (3.5.1.). Jeweils 10 µg RNA wurden auf einem Formaldehydgel (1,5% Agarose) gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf einen Nitrocellulosefilter gegen eine radioaktiv markierte pdSV8neo-Probe hybridisiert.

Die Autoradiographie (Abb. 7) zeigte eine bei allen Klonen (Spuren 2-14) auftretende Bande neo-spezifischer mRNA unterschiedlicher Stärke, die zwischen den Hintergrundbanden der 18S und 28S rRNAs lag. In Spur 1 ist zum Vergleich die RNA eines mit pSV2 transfizierten resistenten Zellklons aufgetragen.

Es entsprachen die RNAs der Zellklone der Spuren 14, 12, 11, 10 und 8 der Abb. 7 den DNAs der Zellklone der Spuren 7, 5, 12, 8 und 13 der Abb. 6 (in der genannten Reihenfolge). Es ließ sich somit kein Zusammenhang zwischen der Stärke der mRNA und dem Integrationsmuster des jeweiligen Zellklons erkennen.

Das Auftreten einer neo-spezifischen mRNA war ein Hinweis darauf, daß die resistenten Zellklone aufgrund des gebildeten neo-Genprodukts entstanden waren, dessen Transkription erst durch die Kompensation des defekten Promotors durch zelluläre Sequenzen ermöglicht werden konnte. Jedoch bestand auch noch die Möglichkeit, daß die Resistenz der Zellklone durch die multiplen Integrationen des neo-Gens und somit aus der Summe der Restaktivitäten der defekten Promotoren entstanden waren.

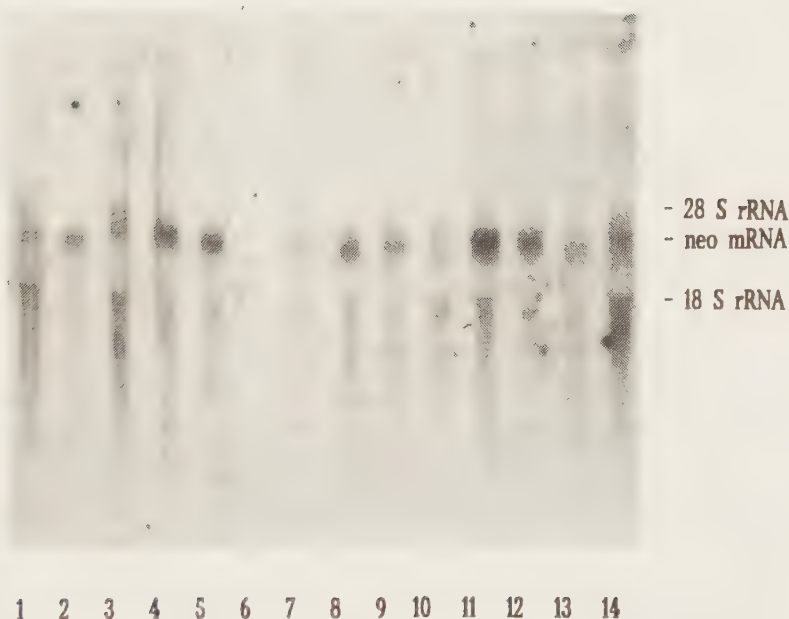


Abb. 7: Northern Blot Analyse resistenter Zellklone der 1. Transfektionsrunde
2-14: RNA (10 μ g) von 13 verschiedenen resistenten Klonen der 1. Transfektions-
runde wurde auf einem 1,5%igen Formaldehydgel aufgetrennt, auf Nitrocelulose-
filter transferiert und hybridisiert. Die Größe der ribosomalen RNAs (18 S
rRNA, 28 S rRNA) ist angezeigt.

Spur 1: RNA (10 μ g) eines mit pSV2neo-transfizierten Zellklons als Mengen-
und Größenmarker

Spuren 2, 5-7, 9-12: RNA pdSV8neo-transfizierter Klone

Spuren 3, 4, 8, 13-14: RNA pSV0neo-transfizierter Klone

Hybridisierungsprobe: 32 P-markiertes pdSV8neo

In der Southern Blot Analyse wurde gezeigt, daß alle Klone multiple Insertionen des Resistenzplasmids pdSV8neo aufwiesen. Daher war unklar, welche dieser Insertion(en) für eine funktionsfähige neo mRNA kodierte(n) und somit im Einflußbereich einer transkriptionsaktivierenden zellulären Sequenz lag(en), der ja das eigentliche Interesse galt.

Es war deshalb ein zweiter Transfektionsschritt nötig, um zu einer Einzelkopie-Insertion zu gelangen.

4.6. Transfektion von BHK-Zellen mit DNA-Fragmenten resistenter Klone (2. Transfektionsrunde)

Es wurden Zellklone der ersten Transfektionsrunde ausgewählt, deren DNA vergleichsweise wenige Insertionen von pdSV8neo aufwiesen (Klone aus den Spuren 2, 5, 9 und 11 in Abb. 6).

Je 20 µg genomische DNA solcher Klone wurden in 150 µl TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen und ca. 1 Sekunde ultraschallbehandelt.

Die DNA wurde anschließend gefällt, gewaschen und in TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen. Eine elektrophoretische Auftrennung von je 1 µg der beschallten DNA zeigte, daß die Behandlung DNA-Fragmente eines Größenbereichs von ca. 7 - 10 kb erbracht hatte (ohne Abb.). DNA-Fragmente dieser Länge sollten groß genug sein, um das integrierte neo-Plasmid mit dem angrenzenden zellulären Bereich intakt zu lassen, andererseits klein genug, um noch von der Zelle aufgenommen werden zu können.

Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Zelle bei der Transfektion mehr als ein DNA-Fragment aufnimmt, welches ein integriertes neo-Plasmid enthält, wurde so stark herabgesetzt. Auf diese Weise hoffte man, Einzelkopie-Insertionen zu erhalten.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der zweiten Transfektion war der, daß durch den Verdünnungseffekt eine Selektion auf stark exprimierte neo-Gene gegeben war und somit auf hoch aktive zelluläre Transkriptionsaktivatoren.

Für die Transfektion wurden je 100 ng ultraschallbehandelter DNA ausgewählter Zellklone aus der 1. Transfektionsrunde zusammen mit 10 µg BHK-Träger-DNA (ultraschallbehandelt; Fragmentgrößen ca. 100 bp, siehe 1. Transfektionsrunde) eingesetzt.

Es wurden 10 Platten (140 mm) mit beschallter DNA pdSV8neo-transfizierter Zellklone sowie je 2 Platten (140 mm) mit beschallter DNA von pSV0neo- und pSV2neo-transfizierten Zellklonen der 1. Runde transfiziert. Nach 24 h wurden 600 µg/ml G418 zugesetzt und nach 3 - 4 Wochen die ersten resistenten Klone isoliert.

Die Ausbeuten an resistenten Zellklonen war vergleichbar mit den Werten der 1. Transfektionsrunde, jedoch war diesmal ein ausgeprägter Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit einzelner Klone zu beobachten.

Es wurden nur besonders gut wachsende Zellklone isoliert, da von diesen anzunehmen war, daß sie unter der Kontrolle eines starken zellulären Aktivatorelements standen.

Unter diesen Zellklonen war keiner mehr, der aus ursprünglich mit Azacytidin behandelten Zellen stammte. Zellen dieser Art zeigten nach der zweiten Transfektionsrunde ein geringes Wachstum und wurden aus den erwähnten Gründen nicht weiter verfolgt.

4.6.1. Southern Blot Analyse resistenter Zellklone aus der 2. Transfektionsrunde

Um die Frage der Integration von pdSV8neo bzw. pSV0neo und pSV2neo zu klären, wurden wiederum Southern Blot Analysen durchgeführt.

Auf Mikrotiterplatten vereinzelte G418 resistente Klone wurden auf 140 mm Platten kultiviert und zur DNA-Präparation verwendet.

Jeweils 20 µg genomische DNA einzelner Klone wurden mit Bam HI geschnitten, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf einen Nitrocellulosefilter transferiert. Als radioaktiv markierte Probe wurde wiederum pdSV8neo verwendet.

In Abb. 8 ist die Autoradiographie eines solchen Blots gezeigt.

Die hier dargestellten Klone 1 und 2 (entstanden aus der Transfektion mit DNA-Fragmenten aus ursprünglich mit zirkulärem pdSV8neo transfizierten Zellklonen) zeigten die für eine Einzelkopie-Insertion erwarteten 2 Banden, bestehend aus jeweils einem Plasmid- und einem zellulären Anteil. Bam HI schneidet - wie erwähnt - einmal in der Plasmid-DNA; die beiden anderen Bam HI-Schnittstellen, die zur Entstehung der beiden Banden führen, müssen somit in der angrenzenden zellulären DNA lokalisiert sein.

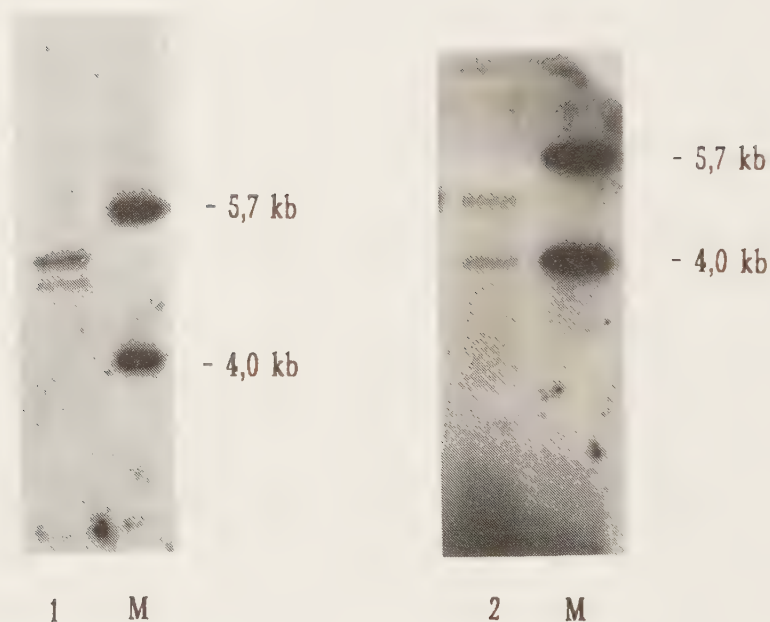


Abb. 8: Southern Blot Analyse von zwei resistenten Zellklonen der 2. Transfektionsrunde

M: Größenmarker (siehe Abb. 6)

Spuren 1+2: Bam HI-geschnittene genomische DNA (20 μ g) von 2 verschiedenen, ursprünglich mit pdSV8neo transfizierten resistenten Zellklonen der 2. Transfektionsrunde wurde auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter transferiert und hybridisiert.

Hybridisierungsprobe: 32 P-markiertes pdSV8neo

Die unterschiedliche Intensität der Banden bei Klon 1 könnte damit erklärt werden, daß durch die Integration von pdSV8neo das Plasmid ganz in der Nähe der Bam HI-Schnittstelle geöffnet wurde. Somit erhielt ein Bam HI-Fragment den Hauptteil des Plasmids, während auf dem zweiten Bam HI-Fragment nur eine kurze Plasmid-DNA-Sequenz zu finden war, die bei der Hybridisierung dann das schwächere Signal ergab. Da pdSV8neo eine Größe von ca. 5,7 kb hat, würde diese Möglichkeit eine Deletion im Plasmidanteil voraussetzen (das größere, stärker hybridisierende Fragment hat nur eine Länge von ca. 5,1 kb). Solche Deletionsvorgänge konnten in der Tat später beobachtet werden (siehe Diskussion).

Bei einigen Klonen wurden drei hybridisierende Banden gefunden, von denen die kleinste in etwa Plasmidgröße hatte (ohne Abb.). Dies ließ auf eine Tandemintegration von pdSV8neo schließen, wobei die beiden größeren Banden wahrscheinlich Plasmidanteil und angrenzende zelluläre Sequenzen darstellten. Diese Klone wurden für die weiteren Experimente jedoch nicht verwendet.

4.6.2. Northern Blot Analyse resistenter Zellklone aus der 2. Transfektionrunde

Für die Auswahl derjenigen Zellklone, aus denen die benachbarten Sequenzen zu pdSV8neo (in Einzelkopie-Insertion vorliegend) kloniert werden sollten, war von Interesse, wie stark das neospezifische Gen in diesen Zellen exprimiert wurde.

Von einzelnen resistenten Zellklonen, die eine Einzelkopie-Insertion des neo-Gens aufwiesen, wurde deshalb RNA isoliert. Jeweils 20 µg cytoplasmatischer RNA wurden auf einem 1,5%igen Formaldehydgel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen und mit ^{32}P -markiertem pdSV8neo hybridisiert (Abb 9).

Es zeigte sich, daß von den einzelnen Klonen unterschiedliche Mengen an neospezifischer mRNA gebildet wurden. Ein zum Vergleich transfiziertes Wildtyp-Plasmid (wt= pSV2neo; Einzelkopie-Insertion war durch Southern Blot Analyse nachgewiesen worden) ergab eine bestimmte Menge an neospezifischer mRNA, die von einem Klon (Spur 4) übertroffen wurde. Dies ließ auf den Einfluß eines starken zellulären Transkriptionsaktivators schließen. Die anderen hier gezeigten Klone erreichten zum Teil eine geringere Intensität der neospezifischen Bande (Spuren 1 und 2). Zur Kontrolle, daß gleiche Mengen RNA eingesetzt worden waren, war eine Hybridisierung des Filters mit ^{32}P -markierter SV40-DNA vorgenommen worden, wobei eine RNA-Bande von ca. 5S als interner Standard verwendet wurde (ohne Abb.).

Zumindest im Falle des Klons der Spur 4 war die hohe mRNA-Rate korreliert mit einem extrem schnellen Wachstum im Selektionsmedium.

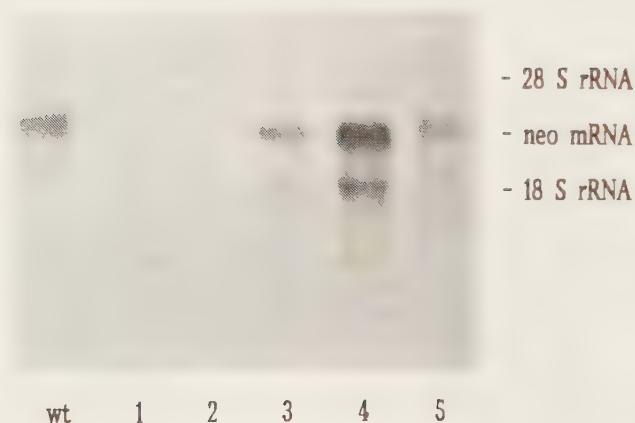


Abb. 9: Northern Blot Analyse resistenter Zellklone der 2. Transfektionsrunde
 wt: RNA (20 µg) eines mit pSV2 transfizierten resistenten Zellklons als Mengen- und Größenmarker
 Spuren 1-5: RNA (20 µg) von 5 verschiedenen, ursprünglich mit pdSV8neo transfizierten Zellklonen der 2. Transfektionsrunde, bei denen eine Einzelkopie-Insertion von pdSV8neo vorlag. Die RNAs wurden auf einem 1,5%igen Formaldehydgel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter transferiert und hybridisiert.
 Hybridisierungsprobe: ^{32}P -markiertes pdSV8neo

Die Klone 1 und 2 der Abb. 8 entsprechen den Klonen 1 und 2 der Abb. 9. Da die Menge an neospezifischer RNA in diesen beiden Zellklonen sehr gering war, wurden sie für die Auswahl der Zellklone, aus denen die zellulären Integrationssequenzen isoliert werden sollten, nicht herangezogen. Statt dessen wurden die Klone 3 und 4 der Abb. 9 weiterverwendet (Einzelkopie-Integration war nachgewiesen worden; siehe auch Abb. 10). Diese beiden Klone stammten ebenfalls aus Transfektionen mit DNA-Fragmenten von resistenten Zellklonen der 1. Transfektionsrunde, die mit zirkulärem pdSV8neo transfiziert worden waren.

Somit war man jetzt im Besitz von Zellklonen, bei denen eine Einzelkopie Insertion des Resistenzplasmids vorlag und bei denen eine funktionsfähige neospezifische mRNA gebildet wurde. Eine Kompensation durch Restaktivitäten mehrfach inserierter defekter Promotoren konnte in diesen Fällen ausgeschlossen werden. Die Hypothese war weiterhin, daß ein zellulärer DNA-Bereich die Funktion des deletierten Enhancers übernommen hatte und hierdurch aus dem ursprünglich defekten SV40 Promotor wieder ein voll aktiver rekonstituiert worden war.

Als nachstfolgender Schritt ergab sich somit der Versuch, dieses zelluläre Element, d.h. den zellulären Integrationsbereich am 3' Ende des Plasmids, zu isolieren.

4.7. Amplifikation von Einzelkopiesequenzen durch Fusion

Da die Klonierung von Einzelkopiesequenzen aus genomischer DNA nicht einfach ist und langwieriges Durchmustern von Phagenplaques bzw. Bakterienkolonien erfordert, wurde ein Amplifikationsschritt zwischengeschaltet. Dieser sollte dazu führen, daß die Einzelkopiesequenz in angereicherter Form vorlag, und somit die Klonierung vereinfachen.

Hierzu wurden einzelne, aus der Transfektion mit pdSV8neo hervorgegangene resistente Zellklone der 2. Transfektionsrunde mit COS-1-Zellen fusioniert. COS-1-Zellen enthalten den zur SV40 Replikation benötigten permissiven Faktor und produzieren konstitutiv T-Antigen, sind aber ori^- , d.h. sie tragen eine Deletion im Ursprungsbereich.

Die Überlegung war folgende: Nach der Fusion bindet das T-Antigen aus der COS-1-Zelle an den intakten SV40-Origin-Bereich (siehe auch Abb. 2b) des in die BHK-DNA integrierten Resistenzplasmids und mit Hilfe des permissiven Faktors wird der Replikationsvorgang angeschaltet. An die neu synthetisierten ori-Regionen bindet wiederum T-Antigen und es wird von neuem repliziert ("onion skin"-Modell). Da die Replikation bidirektionell verläuft und die Replikationsgabel nach beiden Richtungen über einen längeren DNA-Bereich hin fortschreitet, sollten nicht nur Plasmidbereiche, sondern auch angrenzende zelluläre Regionen bei diesem Prozeß amplifiziert werden.

Zum experimentellen Vorgehen: BHK-Zellen (Klone der Spuren 3 und 4 der Abb. 9) wurden mit COS-1-Zellen fusioniert (je zwei Platten) und nach 48 h wurde von einer Platte genomische DNA und von der zweiten niedermolekulare DNA isoliert.

In Abb. 10 ist das Ergebnis eines solchen Versuchs dargestellt.

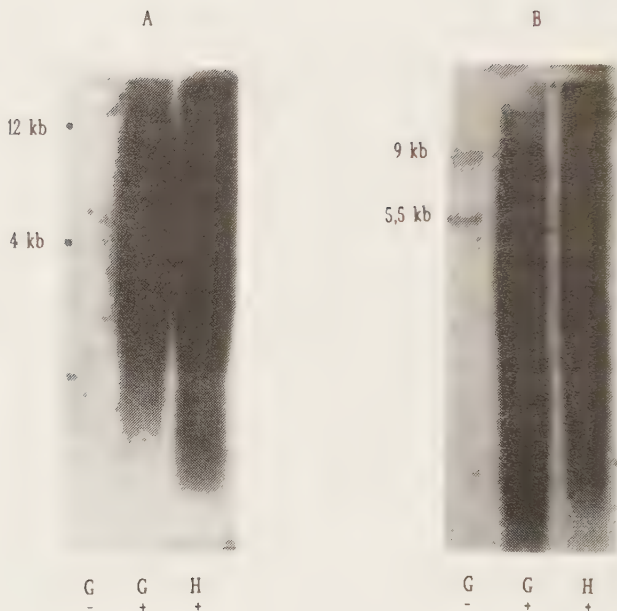


Abb. 10: Southern Blot Analyse resistenter Zellklone vor und nach der Fusion mit COS-1-Zellen

A: Klon 1 (Spur 4 in Abb. 9)

B: Klon 2 (Spur 3 in Abb. 9)

G-: genomische DNA (20 µg), Bam HI-geschnitten

G+: genomische DNA (10 µg) nach der Fusion, Bam HI-geschnitten

H+: niedermolekulare DNA nach der Fusion, ungeschnitten

Die DNAs wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter transferiert und hybridisiert.

Hybridisierungsprobe: ^{32}P -markiertes pdSV8neo

Bei A (Klon 1) sind die in der Spur G- schlecht sichtbaren Einzelkopie-Banden durch Punkte angezeigt.

In den Spuren G waren je 20 µg genomische DNA des Klons 1, Teil A der Abb. (entspricht Abb. 9 Spur 4), bzw. des Klons 2, Teil B der Abb. (entspricht Abb. 9 Spur 3), mit Bam HI geschnitten worden und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Spuren G+ enthielten je 10 µg genomische DNA dieser Klone nach der Fusion, ebenfalls Bam HI geschnitten, und die Spuren H+ enthielten je 10 µg ungeschnittene niedermolekulare DNA ("Hirt supernatant DNA") der Klone nach der Fusion. Die DNAs wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter geblottet und hybridisiert. Als radioaktiv markierte Probe wurde wiederum pDSV8neo verwendet.

Ein densitometrischer Vergleich zwischen der Stärke einer Einzelkopiebande der genomischen DNA mit dem entsprechenden Bereich in der Spur mit der DNA aus fusionierten Zellen ergab einen Amplifikationswert von über 60fach. Extrapoliert über den gesamten Fragmentbereich ergab dies einen Multiplikationsfaktor von mehr als 10^3 .

In den Spuren mit der DNA aus fusionierten Zellen (G+ und H+) waren hybridisierende DNA-Fragmente eines breit gestreuten Größenbereichs zu erkennen, die einen dichten "Schmier" bildeten. Spur G+ enthielt somit amplifizierte Replikationsformen, die noch mit der genomischen DNA verbunden waren, während Spur H+ niedermolekulare, von der genomischen DNA abgelöste DNA-Fragmente enthielt.

In der Spur G- des Klons 1 ist die Einzelkopiebande schlecht sichtbar und deshalb durch Punkte gekennzeichnet.

Ein auffallender Punkt an dem gezeigten Hybridisierungsmuster der Bam HI-geschnittenen genomischen DNA mit und ohne Fusion war, daß in der amplifizierten DNA keine dominanten Banden in Höhe der Einzelkopiebanden der nicht fusionierten DNA auftraten. Wenn man das Modell einer sich nach beiden Richtungen ausbreitenden Replikationsgabel zugrunde legt, sollten nach Bam HI-Verdau der amplifizierten DNA dominante Banden gleicher Größe wie die durch die Integration des Plasmids in die genomische DNA entstehenden Fragmente (nach Bam HI-Verdau) auftreten.

Dies war aber nicht der Fall, statt dessen ergab sich eine über einen weiten Größenbereich gleichmäßig verteilte Dichte hybridisierender Fragmente, worunter auch Fragmente einer größeren Länge als die der beiden Bam HI-Fragmente waren.

4.8. Klonierungsstrategien

Ein erster Versuch zur Klonierung der amplifizierten zellulären Sequenzen war, die DNA aus fusionierten Zellen mit Enzymen zu verdauen, die nicht im integrierten Plasmid schneiden, sondern außerhalb im Genom der BHK-Zelle. Einer anschließenden Rezirkularisierung sollte dann die Transformation von Bakterien folgen. Da in dem zirkulären DNA-Fragment das Plasmid pdSV8neo mit bakteriellem Origin und Ampicillinresistenzgen enthalten sein sollte, wären Ampicillin-resistente Klone zu erwarten gewesen.

Dieser Versuch wurde mit den Restriktionsenzymen Cla I und Kpn I (für beide gibt es keine Schnittstellen im Plasmid) durchgeführt, erbrachte jedoch keine Bakterientransformanten.

Eine Erklärungsmöglichkeit war, daß die Schnittstellen von sowohl Cla I wie auch Kpn I in zu großem Abstand von der Integrationsstelle des Plasmids lagen und eine Rezirkularisierung somit DNA-Moleküle lieferte, die für die Aufnahme in Bakterienzellen zu groß waren.

Der Versuch, Bam HI-Fragmente der amplifizierten DNA in pUC 12 zu klonieren, führte zwar zu Bakterientransformanten; diese enthielten jedoch nicht das gesuchte, den SV40 Origin enthaltende Fragment, wie durch Hybridisierung von Koloniefilterabzügen und mit einem SV40-Origin-Oligonukleotid (siehe 3.6.5.) gezeigt werden konnte. Der Grund dafür war wahrscheinlich in den oben erwähnten, fehlenden dominanten Bam HI-Banden zu suchen.

4.9. Restriktionsanalyse amplifizierter DNA

Somit bestand zunächst die Aufgabe darin, geeignete Restriktionsenzyme zu finden, die zu definierten Banden amplifizierter DNA-Fragmente führten.

Geeignet erschien z.B. Hind III, welches den Promotorbereich vom neo-Gen abtrennte und keine weitere Schnittstelle im Plasmid aufwies.

Ein Restriktionsverdau amplifizierter niedermolekularer DNA (1 µg) von Klon 2 (aus Abb. 10) mit Hind III wurde auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter transferiert und mit einem ³²P-markierten SV40 Origin Oligonukleotid (siehe 3.6.5.) hybridisiert. Die Autoradiographie (Abb. 11, linker Teil, Spur 1) zeigte ein dominantes Fragment von ca. 4,5 kb. Dies bedeutete, daß innerhalb der amplifizierten zellulären DNA 4,5 kb von der Hind III-Schnittstelle des Plasmids entfernt eine weitere Hind III-Schnittstelle liegen mußte.

Spur 2 zeigt einen Hind III/Cla I Doppelverdau. Das auftretende Fragment hatte die gleiche Größe wie das Hind III-Fragment, woraus man schließen konnte, daß keine Cla I-Schnittstelle näher an der Integrationsstelle des Plasmids lag als die Hind III-Schnittstelle in 4,5 kb Entfernung.

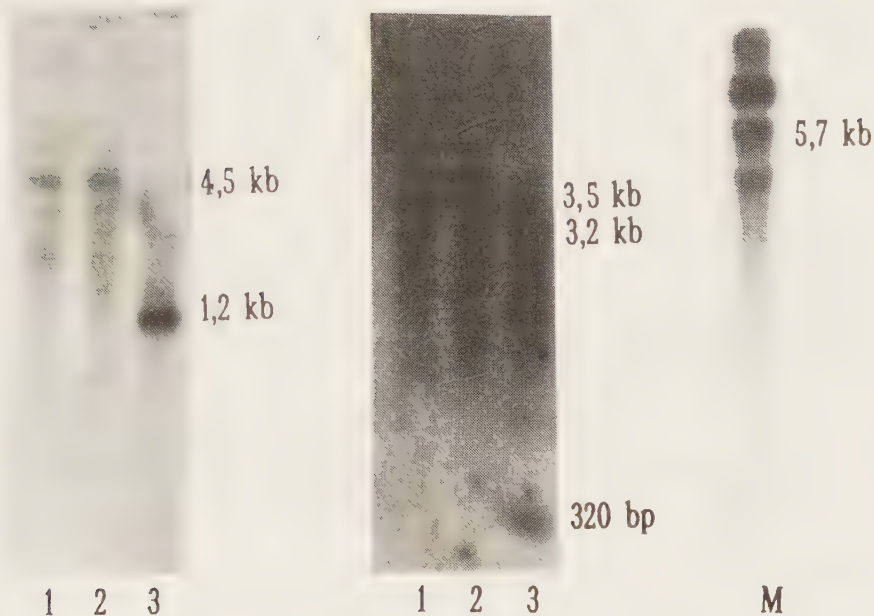


Abb. 11: Southern Blot Analyse amplifizierter niedermolekularer DNA von Klon 2 (aus Abb. 10)

Je 1 µg amplifizierter, niedermolekularer DNA von Klon 2 wurde mit Hind III (Spur 1), Hind III/Cla I (Spur 2) und Hind III/Bgl II (Spur 3) verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter transferiert und hybridisiert.

Auf dem linken Teil der Abb. ist die Hybridisierung mit einem ^{32}P -markierten SV40-Origin-Oligonukleotid angezeigt; der rechte Teil der Abb. zeigt die Hybridisierung mit ^{32}P -markiertem pdSV8neo.

Die Markerspurs (M) zeigt ungeschnittenes pdSV8neo, wobei die mittlere Spur der linearisierten Form von 5,7 kb entspricht.

Ein Hind III/Bgl II Doppelverdau (Spur 3) lieferte ein Fragment von ca. 1,2 kb Länge. Dies zeigte, daß innerhalb des Hind III-Fragments eine Bgl II-Schnittstelle im Abstand von 1,2 kb zu der Hind III-Schnittstelle im Plasmid lokalisiert war.

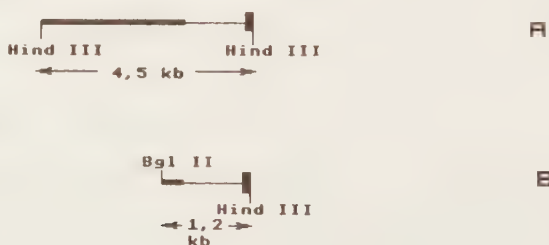
Eine Kontrollhybridisierung mit radioaktiv markiertem Gesamtplasmid pdSV8neo (Abb.11 rechter Teil) erbrachte folgerichtig auch die dominanten Banden nach Verdau mit den jeweiligen Enzymen, die durch das Fortschreiten der Replikationsgabel in die andere Richtung entstanden waren.

So ergaben der Hind III- sowie der Hind III/Cla I-Doppelverdau jeweils eine zusätzliche Bande von 3,5 kb, die den das neo-Gen enthaltenden Plasmidanteil sowie zelluläre DNA bis zu einer Hind III-Schnittstelle im BHK-Genom repräsentierte (Abb. 12). Auch hier war keine Cla I-Schnittstelle näher an der Integrationsstelle des Plasmids als die Hind III-Schnittstelle. Ein Hind III/Bgl II Doppelverdau erbrachte drei Banden (3,2 kb, 1,2 kb, 320 bp), von denen die 320 bp Bande ein Hind III/Bgl II-Fragment darstellte, das durch eine Bgl II-Stelle im neo-Gen entstand.

Abb. 12 zeigt ein Integrations-und Hybridisierungsschema.



Probe SV48 Origin Oligonukleotid:



Probe pdSV8 neo

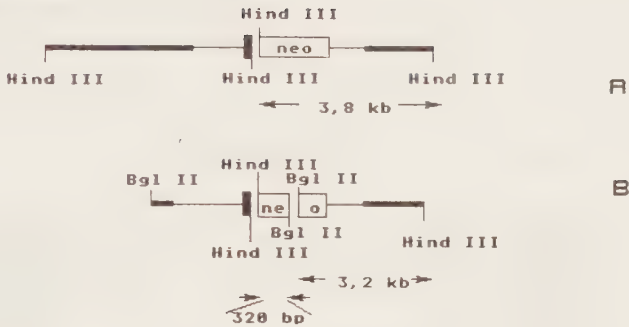


Abb. 12: Integrations- und Hybridisierungsschema

Dargestellt ist die Integration von pdSV8neo in das BHK-Genom und die jeweils entstehenden Banden nach Verdau mit den entsprechenden Enzymen und anschließender Hybridisierung mit dem SV40-Origin-Oligonukleotid oder pdSV8neo.

A: Spaltung mit Hind III bzw. Hind III/Cla I

B: Spaltung mit Hind III/Bgl II

einfache Linie: Plasmid-DNA mit angezeigtem neo-Resistenzgen

breite Linie: zelluläre DNA

Bei einem weiteren fusionierten Klon der 2. Transfektionsrunde (Abb. 10, Klon 1) wurde nach dem gleichen Restriktionsprinzip verfahren. Hierbei ergab sich ebenfalls eine dominante Hind III/Bgl II-Bande von ca. 600 bp Länge (ohne Abb.).

4.10. Klonierung amplifizierter zellulärer Integrationssequenzen in pUC 12

Zur Klonierung wurden daraufhin Hind III/Bgl II-Fragmente aus amplifizierter DNA dieser beiden Zellklone mit pUC 12 Plasmid, Hind III/Bam HI geschnitten, ligiert und in Bakterien transformiert. Koloniehybridisierungen Ampicillin-resistenter Klone mit radioaktiv markiertem SV40-Origin-Oligonukleotid ergaben mit einer Häufigkeit von 10^{-2} positive Klone.

Jeweils 6 dieser positiven Klone wurden isoliert, durch Vereinzeln und weitere Hybridisierungen gereinigt und zur Schnell-Isolierung von Plasmid-DNA verwendet. Durch Herausschneiden der Insertionen aus dem pUC 12-Polylinker mit Hind III und Eco RI (siehe auch Abb. 20) wurde die Richtigkeit der Klone bestätigt.

Auf diese Weise war man schnell in den Besitz zweier Klone mit den zellulären Integrationssequenzen, die an den defekten Promotor des inserierten Plasmids angrenzten, gelangt. Für die folgenden Ausführungen werden diese Klone mit pUC 12/1 (0,6 kb Insertion) und pUC 12/2 (1,2 kb Insertion) bezeichnet.

4.11. Restriktionsanalyse der klonierten zellulären Sequenzen

Von pUC 12/1 als auch von pUC 12/2 wurde Plasmid-DNA über Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mit entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten. Die DNA-Fragmente wurden anschließend auf 1%-2%igen Agarosegelen aufgetrennt und zum Teil nach Transfer auf Nitrocellulosefilter zur Hybridisierung verwendet.

Zunächst wurden pUC 12/1 und pUC 12/2 sowie pdSV8neo mit Hind III und Sph I gespalten, um das defekte Promotorfragment in beiden Klonen nachzuweisen (siehe auch Abb. 2b).

Abb. 13, linker Teil zeigt die über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennten Fragmente, Abb. 14a, linker Teil die Autoradiographie dieses Gels nach Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten SV40 Origin Oligonukleotid (die schwach hybridisierenden großen Banden des restlichen Plasmid-Fragments sind auf einen unvollständigen Verdau zurückzuführen).

Sowohl in pUC 12/1 (Spur 3) als auch in pUC12/2 (Spur 2) war das 198 bp lange Promotorfragment aus pdSV8 (Spur 1) enthalten.

In Abb. 14b ist das 198 bp Promotorfragment aus pdSV8neo schematisch dargestellt (siehe auch Abb. 3c).

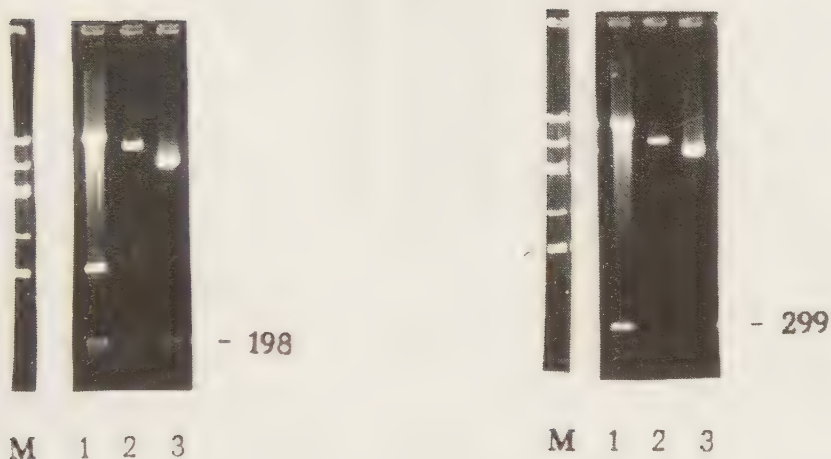


Abb. 13: Linker Teil: Nachweis des defekten Promotors in pUC 12/1 und pUC 12/2

Spur 1: pdSV8neo

Spur 2: pUC 12/2

Spur 3: pUC 12/1

Jeweils 1 µg Plasmid-DNA wurde mit Hind III/Sph I geschnitten und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

Marker: 5,7 kb; 3,4 kb; 2,4 kb; 2,3 kb; 1,4 kb; 0,96 kb; 0,92 kb

Rechter Teil: Restriktionsanalyse von pUC 12/1 und pUC 12/2

Je 1 µg Plasmid-DNA von pdSV8neo (Spur 1), pUC 12/2 (Spur 2) und pUC 12/1 (Spur 3) wurde mit Hind III/Sal I verdaut und die Fragmente wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

Marker: siehe linker Teil der Abb.

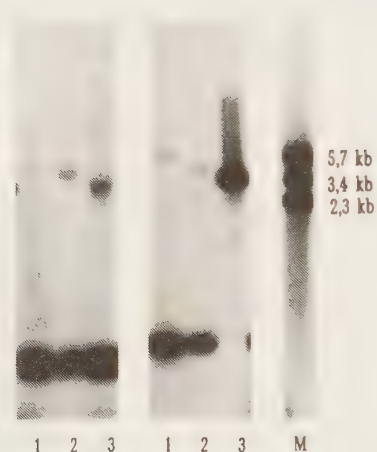


Abb. 14a; Linker Teil: Autoradiographie des Gels aus Abb. 13, linker Teil, nach Transfer auf Nitrocellulosefilter und anschließender Hybridisierung mit ^{32}P -markiertem SV40-Origin-Oligonukleotid.

Marker: 5,7 kb; 3,4 kb; 2,3 kb

Abb. 14a; Rechter Teil: Autoradiographie des Gels aus Abb. 13, rechter Teil, nach Transfer auf Nitrocellulosefilter und anschließender Hybridisierung mit ^{32}P -markiertem SV40-Origin-Oligonukleotid.

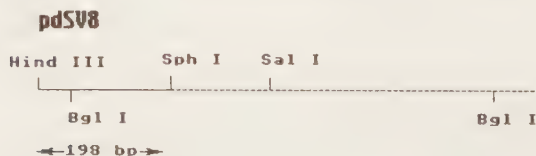


Abb. 14b: Schematische Darstellung des 198 bp Restriktionsfragments aus dem Verdau mit Hind III/Sph I (bei pdSV8neo)
gestrichelte Linie: Plasmid-DNA

In Abb. 13, rechter Teil, ist der Verdau von pUC 12/1 (Spur 3), pUC 12/2 (Spur 2) und pdSV8neo (Spur 1) mit Hind III und Sal I gezeigt.

Sal I schneidet 299 bp von Hind III entfernt im Plasmidanteil des Nru I/Hind III-Promotorfragments (siehe 4.2. und Abb. 14c). Man konnte sowohl im Agarosegel (Abb. 13, rechter Teil) als auch in der Autoradiographie (Abb. 14a, rechter Teil; die markierte Probe war wieder das Origin-Oligonukleotid) erkennen, daß die erwartete Hind III/Sal I-Bande außer bei pdSV8neo (Spur 1) nur bei pUC 12/2 (Spur 2) auftrat, nicht aber bei pUC12/1 (Spur 3).

Daraus konnte man schlußfolgern, daß die Öffnung des Plasmids bei der Integration in pUC 12/1 zwischen der Sph I-Schnittstelle, die den defekten Promotor begrenzt und der mit ca. 100 bp Abstand folgenden Sal I-Schnittstelle erfolgt sein mußte, und in diesem Bereich somit der Übergang von Plasmid-DNA zu zellulärer DNA zu finden war.

Bei pUC 12/2 dagegen war die Sal I-Schnittstelle des integrierten Plasmids noch erhalten und der Übergang zur zellulären DNA mußte weiter in 5'-Richtung liegen.

In Abb. 14c ist das 299 bp Hind III/Sal I-Fragment aus pdSV8neo sowie der zelluläre Bereich und Übergangsbereich zur Plasmid-DNA in pUC 12/1 (genaue Grenzen sind unbekannt) dargestellt.

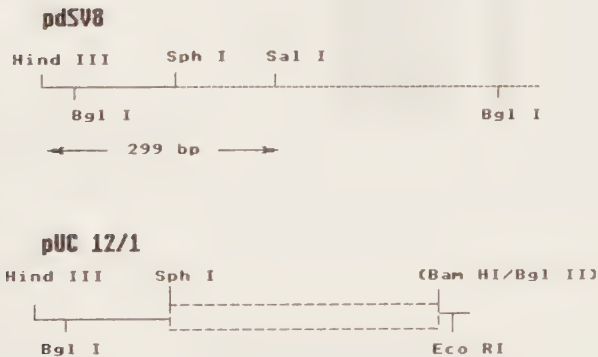


Abb. 14c: Schematische Darstellung des 299 bp Restriktionsfragments aus dem Verdau mit Hind III/Sal I (bei pdSV8neo) sowie der Integration von pUC 12/1

Ein Restriktionsverdau mit Bgl I (Abb. 15a) ergab sowohl bei pdSV8neo (Spur 1) als auch bei pUC 12/2 (Spur 2) nach Auftrennung auf einem Agarosegel ein 503 bp langes Fragment auf, welches wiederum bei pUC 12/1 (Spur 3) fehlte. Dieses Fragment entstand durch eine Bgl I-Schnittstelle, die im defekten Promotor liegt (62 bp von Hind III entfernt) und eine zweite im Plasmidanteil. Hieraus konnte man folgern, daß der Plasmidbereich in pUC 12/2 im 5'-Bereich der Sph I-Stelle eine Länge von über 360 bp haben mußte, bevor der Übergang zur zellulären DNA erfolgt sein konnte. Eine schematische Darstellung dieses Sachverhalts zeigt Abb. 15b.

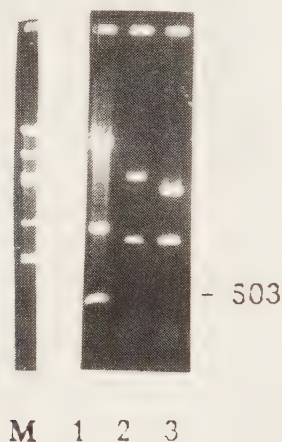


Abb. 15a: Restriktionsanalyse von pUC 12/1 und pUC 12/2
 Je 1 µg Plasmid-DNA von pdSV8neo (Spur 1), pUC 12/2 (Spur 2) und pUC 12/1 (Spur 3) wurde mit Bgl I verdaut und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.
 Marker: siehe Abb. 13a

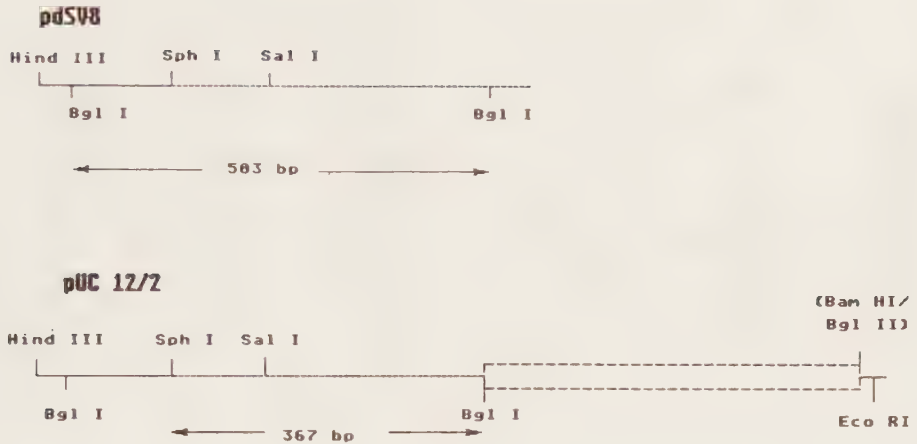


Abb. 15b: Schematische Darstellung des 503 bp Restriktionsfragments aus dem Verdau mit **Bgl I** (bei **pdSV8neo**) sowie von der Integration von **pUC 12/2**
 gestrichelte Linie: Plasmid-DNA
 offene gestrichelte Balken: zelluläre DNA mit Übergangsbereich zur Plasmid-DNA

Ein Restriktionsverdau mit **Kpn I** linearisierte **pUC 12/2**, was auf eine **Kpn I**-Schnittstelle im zellulären Anteil von **pUC 12/2** schließen ließ (ohne Abb.). Ein Verdau mit **Kpn I** und **Eco RI** ergab ein Fragment von 200 bp Länge (ohne Abb.). In **pUC 12/1** war keine **Kpn I**-Schnittstelle vorhanden.

Ein Doppelverdau mit **Pst I/Eco RI** und **Pst I/Hind III** ergab bei **pUC 12/1** Fragmente von ca. 220 bp bzw. 360 bp Länge (Abb. 16a, Spuren 1 und 2).

Ein weiterer Doppelverdau von **pUC 12/1** mit **Pvu II/Eco RI** und **Pvu II/Hind III** lieferte Fragmente von ca. 180 bp, 270 bp und 390 bp bzw. 90 bp, 300 bp und 450 bp Länge (Abb. 16a, Spuren 3 und 4). **Pvu II** schneidet in **pUC 12** in 5'-Richtung 90 bp vom Polylinker entfernt, in 3'-Richtung in ca. 180 bp Entfernung vom Polylinker (Abb. 16b).

Weder **Pst I** noch **Pvu II** lieferten Restriktionsfragmente in **pUC 12/2**.

Bei diesen Restriktionsverdaus entstand zusätzlich jeweils das große Plasmidfragment von **pUC 12**, auf das hier nicht weiter eingegangen werden soll.

Abb. 16b zeigt eine schematische Darstellung der Restriktionsfragmente aus den in Abb. 16a. gezeigten Verdaus.

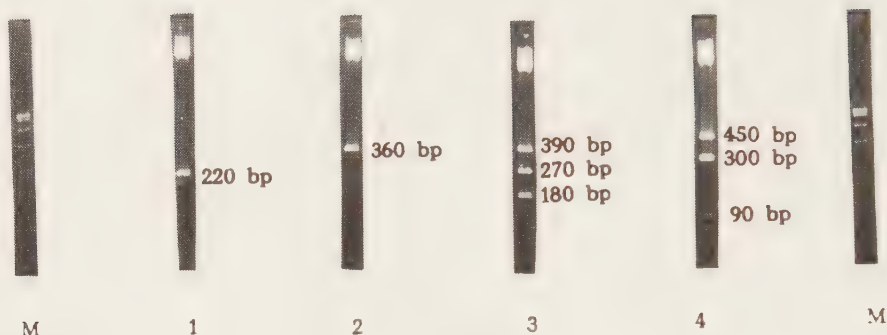


Abb. 16a: Restriktionsverdau von pUC 12/1

Spur 1: Verdau mit Pst I/Eco RI

Spur 2: Verdau mit Pst I/Hind III

Spur 3: Verdau mit Pvu II/Eco RI

Spur 4: Verdau mit Pvu II/Hind III

Je 1 µg DNA wurde in die Restriktion eingesetzt und die Fragmente auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

Marker: 659/655 bp, 622 bp, 521 bp, 401 bp, 257 bp, 226 bp, 136 bp (pAT 153 geschnitten mit Alu I)

pUC 12/1

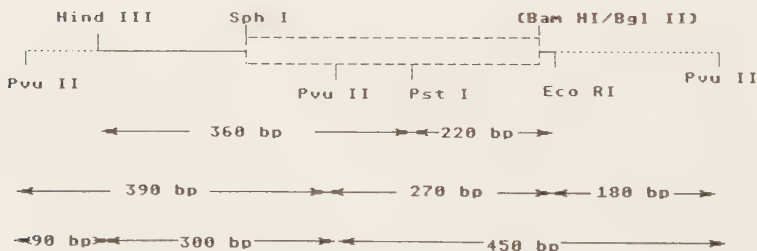


Abb. 16b: Schematische Darstellung der Restriktionsfragmente, die durch den Verdau von pUC 12/1 mit Pst I/Eco RI und Pst I/Hind III bzw Pvu II/Eco RI und Pvu II/Hind III entstanden sind.

Weitere getestete Restriktionsenzyme, die weder in pUC 12/1 noch in pUC 12/2 Schnittstellen aufwiesen, waren: Bam HI, Bgl II, Cla I und Xho I.

Aus den ermittelten Daten ließ sich eine vorläufige Restriktionskarte der beiden Klone erstellen. (Abb. 17 und Abb. 18).

pUC 12/1



Abb. 17: Grobe Restriktionskarte von pUC 12/1

Schraffierte Balken bedeuten zelluläre Sequenzen und gestrichelt eingerahmte Balken Übergangssequenzen zwischen Plasmid-DNA und zellulärer DNA, wobei die exakte Grenze noch nicht bekannt ist.

pUC 12/2



Abb. 18: Grobe Restriktionskarte von pUC 12/2

Gestrichelte Linien stellen Plasmidanteile dar, schraffierte Balken bedeuten zelluläre Sequenzen und gestrichelt eingerahmte Balken Übergangssequenzen zwischen Plasmid-DNA und zellulärer DNA, wobei die exakte Grenze noch nicht bekannt ist.

4.12. Klonierung der zellulären Sequenzen vor das CAT Gen

Es erhob sich als nächstes die Frage, inwieweit die in pUC 12/1 und pUC 12/2 enthaltenen zellulären Sequenzen in der Tat imstande waren, die Aktivität des defekten Promotors von pdSV8 zu erhöhen. Dies war zwar durch das Auftreten neo-resistenter Klone und den Nachweis einer neospezifischen mRNA angedeutet worden, sollte jedoch im transienten Expressionstest überprüft werden.

Hierzu wurden pUC 12/1 und pUC 12/2 mit Hind III und Sma I geschnitten. Sma I liegt im Polylinker von pUC 12 und führte zusammen mit Hind III zur Freisetzung der zellulären Insertionen (beide Insertionen wurden in Hind III/Bgl II des Polylinkers von pUC 12 kloniert und tragen somit gleiche flankierende Polylinkersequenzen; siehe auch Abb. 20).

Dieses Insert-Fragment mit einem Sma I-Ende und einem Hind III-Ende wurde dann - analog zu 4.2. - mit einem Hind III/Bam HI-Fragment aus pSV0 CAT Hind und einem Sma I/Bam HI-Fragment aus pSV0CATSma ligiert.

Mit dem Ligationsansatz wurden Bakterien transformiert und Ampicillin-resistente Klone selektioniert. Die korrekte Anordnung der Fragmente wurde durch Restriktionsverdau einzelner Plasmid-DNAs aus Schnellpräparationen überprüft.

Von je einem CAT-Klon mit den zellulären Elementen aus pUC 12/1 und pUC 12/2 wurde Plasmid-DNA über Dichtegradientenzentrifugation isoliert, gereinigt und für die anschließende Transfektion von BHK-Zellen verwendet.

4.13. CAT-Aktivitätstests von pdSV8 mit den zellulären Sequenzen

Es wurden jeweils 5, 10 und 15 µg Plasmid-DNA der beiden CAT-Klone aus pUC 12/1 und pUC 12/2 sowie die gleichen Mengen der Kontrollplasmide pdSV8CAT und pSV2CAT in BHK-Zellen transfiziert.

Nach 48 h wurden die Proteinextrakte gewonnen und je 250 µg Protein in den Assay eingesetzt.

Abb. 19a zeigt das Ergebnis eines solchen Versuchs.

Das Autoradiogramm der auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgetrennten acetylierten Produkte zeigte deutlich, daß beide zellulären Sequenzen einen stark transkriptionsaktivierenden Einfluß auf den defekten Promotor hatten.

Diese Sequenzen wurden daraufhin HTC-Elemente ("hamster transcription control") genannt.

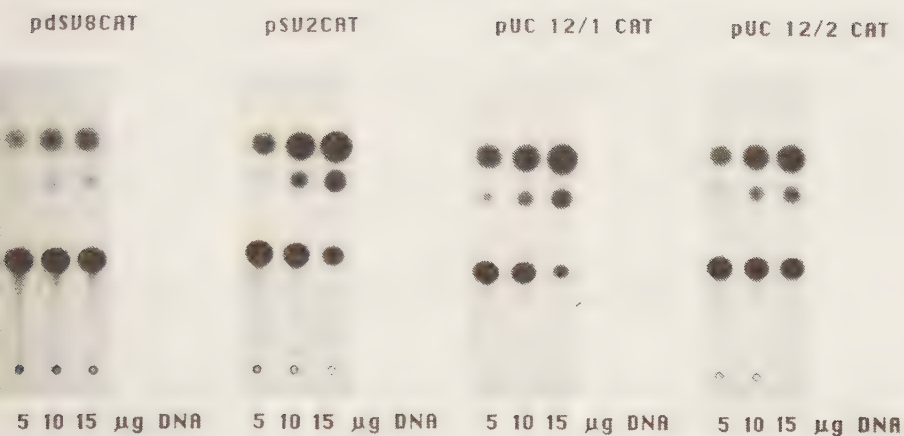


Abb. 19a: CAT-Aktivitätstests von pSV2CAT, pdSV8CAT, pUC 12/1 CAT und pUC 12/2 CAT

BHK-Zellen wurden mit 5, 10 und 15 µg DNA der jeweiligen Plasmide transfiziert. Die Proteinextrakte wurden mit ^{14}C -Chloramphenicol und Acetyl-Coenzym A inkubiert (1 h) und die acetylierten Produkte wurden chromatographisch aufgetrennt (nähere Erläuterungen siehe auch Abb. 4a).

Die acetylierten Produkte wurden in einem Berthold Scintillationszähler gezählt; das Ergebnis ist in Abb. 19b graphisch dargestellt.

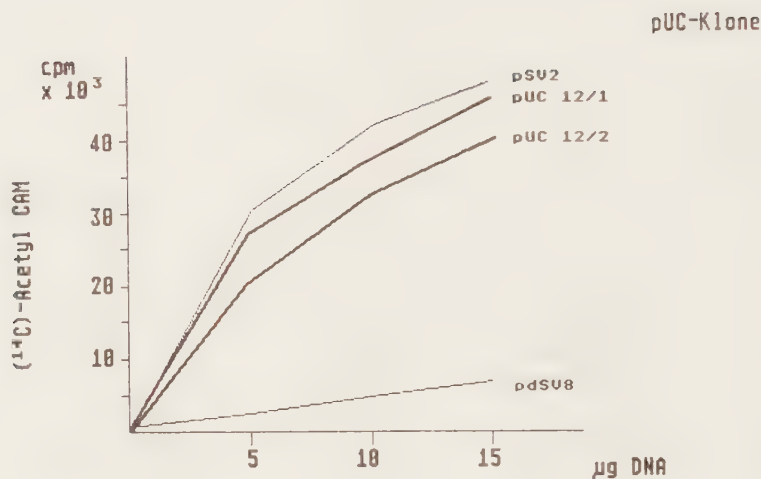


Abb. 19b: Radioaktivitätsmessungen der acetylierten Formen des Chloramphenicols (siehe Abb. 19a). Aufgetragen sind die Zerfälle pro Minute (y-Achse) gegen die transfizierte Menge DNA der jeweiligen Plasmide (x-Achse).

In pHTC₁ CAT (aus pUC 12/1) ließ sich eine bis zu 7fache Steigerung der CAT-Aktivität gegenüber dem defekten Promotor allein erreichen, was ungefähr 95% der Wildtyp-Aktivität von pSV2CAT entsprach.

pHTC₂ CAT (aus pUC 12/2) zeigte eine etwa 5 - 6fach erhöhte Aktivität des pSV8-Promotors, was einer Wildtyp-Aktivität von 80% gleichkam.

Da der SV40 Promotor einer der stärksten bisher bekannten Promotoren ist, zeigten diese Werte, daß es sich bei HTC₂ und besonders bei HTC₁ um transkriptionsaktivierende Sequenzen eines sehr hohen Wirkungsgrades handelte.

4.14. Test auf Enhancereigenschaften von HTC₁ und HTC₂

4.14.1. Klonierung von HTC₁ und HTC₂ an das 3'-Ende des CAT-Gens

Bei dem vorangegangenen Versuch konnte somit gezeigt werden, daß es sich bei HTC₁ und HTC₂ um zelluläre Sequenzen mit promotoraktivierenden Eigenschaften handelte. Als nächstes war die Frage zu klären, ob diese Elemente auch die Funktionen eines Enhancers aufwiesen. Enhancer können unter anderem - wie erwähnt - einen Promotor distanz- und orientierungsunabhängig stimulieren.

Um dies zu testen, wurden HTC₁ und HTC₂ an das 3'-Ende des CAT-Gens in pdSV8CAT kloniert, und zwar in unterschiedlichen Orientierungen.

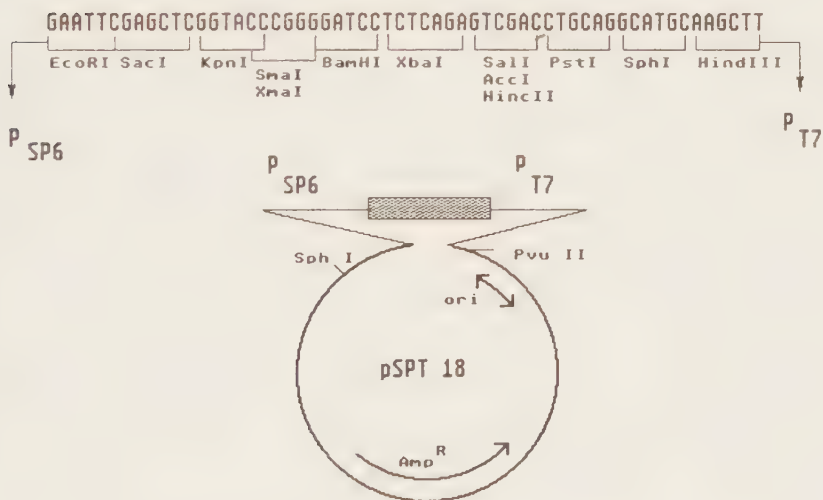


Abb. 20: Plasmid pSPT 18 mit Polylinkerregion

Der Polylinker entspricht dem von pUC 18 bzw. pUC 12 (in verkürzter Form); bei pSPT 19 liegt (wie bei pUC 19 bzw. pUC 13 (in verkürzter Form)) eine umgekehrte Orientierung des Polylinkers vor.

PSP6: SP6-Promotor; PT7: T7-Promotor

Zunächst zur Klonierungsstrategie der 3'-Klone von HTC_1 :

Aus pUC 12/1 wurde wiederum das 600 bp Hind III/Sma I-Fragment isoliert und in pSPT 18, geschnitten mit Hind III und Hinc II (Abb. 20) kloniert. Hierbei gingen bei Ligierung der glatten Enden sowohl die Sma I- als auch die Hinc II- Schnittstelle verloren.

In einem zweiten Schritt wurde aus diesem Plasmid ein Sph I/Sma I-Fragment (ca. 400 bp) herausgeschnitten. Die Sma I-Schnittstelle stammte dabei aus der Polylinkerregion von pSPT 18, und durch den Verdau mit Sph I wurde der Bereich des defekten Promotors von dem Fragment abgetrennt.

Weiterhin wurde pSPT 18 (Abb. 20) mit Sph I und Pvu II geschnitten.

In einer 3-Fragment-Ligation wurden dann folgende Fragmente ligiert:

Sph I-Sph I-Fragment aus pSPT 18

Sph I-Pvu II-Fragment aus pSPT 18 (das große Fragment)

Sph I-Sma I-Fragment mit HTC_1 aus pSPT 18

Der Klonierungsweg ist schematisch in Abb. 21 dargestellt.

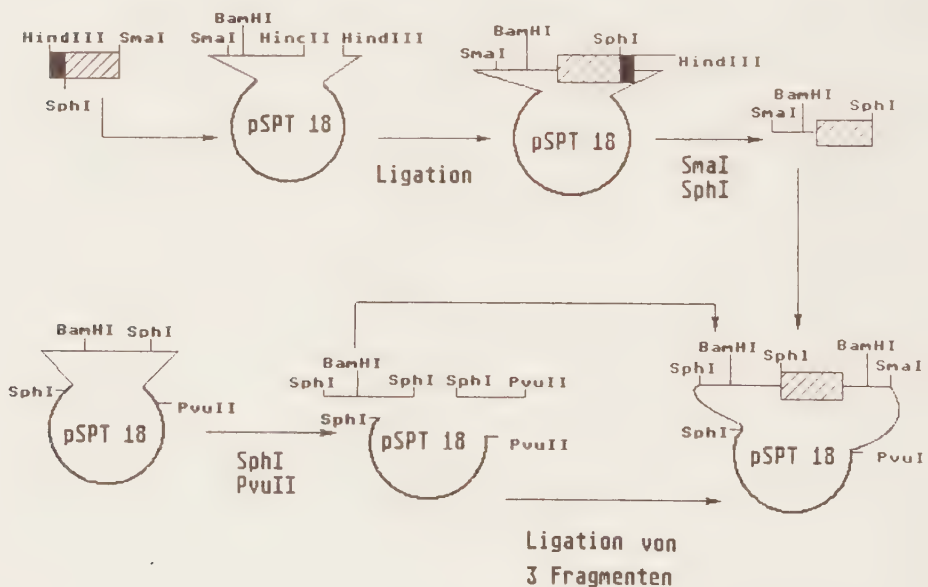


Abb. 21: Klonierungsstrategie der 3'-Klone von HTC_1
 schraffierter Balken: HTC_1 -Element
 ausgefüllter Balken: defekter Promotor

Über diesen Umweg war es gelungen, daß sowohl 3' wie auch 5' von HTC₁ eine Bam HI-Schnittstelle aus dem Polylinker von pSPT 18/19 zu liegen kam. Dieses Bam HI-Fragment wurde isoliert und an das 3'-Ende des CAT-Gens von pSV8CAT (geschnitten mit Bam HI) kloniert.

Es wurden 2 Klone (pHTC₁CAT 3'+ und pHTC₁ CAT 3'-) für die weiteren Experimente verwendet, bei denen das Bam HI-Fragment in jeweils umgedrehter Orientierung vorlag (Abb.23).

Dabei bedeutete HTC₁ 3'+, daß die Basenfolge der zellulären Sequenz wie bei dem 5'-Klon in Richtung des defekten Promotors angeordnet war, während sie bei HTC₁ 3'- in die entgegengesetzte Richtung lief.

Die Orientierung der beiden Klone wurde durch Restriktionsverdau mit Eco RI/Pst I bzw. Eco RI/Pvu II überprüft.

Klonierungsstrategie der 3'-Klone von HTC₂:

Zunächst wurde aus pUC 12/2 ein ca. 900 bp Hinc II/Sma I-Fragment isoliert. Hinc II schneidet wie Sal I 99 bp stromabwärts von Sph I und trennte somit den Promotorbereich von HTC₂ ab.

Dieses Fragment wurde in pSPT 19, geschnitten mit Hinc II, kloniert.

Aus dieser Ligation wurden 2 Klone weiterverwendet:

In einem Klon war das 900 bp Hinc II/Sma I-Fragment einfach vorhanden, in einem zweiten Klon lag eine Tandem-Insertion des Fragments vor, was eine Insertlänge von 1,8 kb ergab. Die Art der Insertion war durch einen Restriktionsverdau mit Kpn I festgestellt worden.

Die Inserts beider Klone wurden durch einen Verdau mit Hind III und Pvu II aus pSPT 19 ausgeschnitten und in pSPT 18, geschnitten mit Hind III und Pvu II, kloniert.

Der Klonierungsweg ist schematisch in Abb. 22 dargestellt.

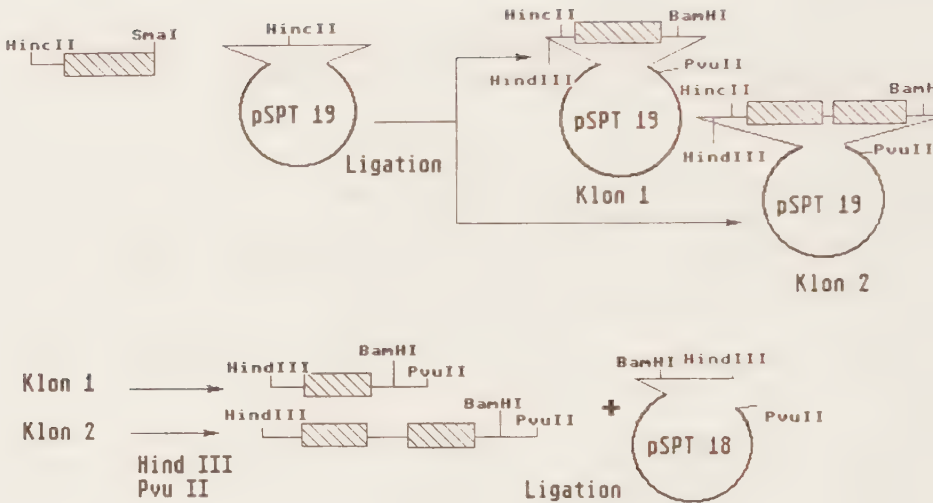


Abb. 22: Klonierungsstrategie der 3'-Klone von HTC₂
 schraffierter Balken: HTC₂-Element

Aus diesen Konstrukten ließen sich jeweils wieder Bam HI-Fragmente isolieren - analog zur Vorgehensweise bei HTC₁ - und in pdSV8CAT, geschnitten mit Bam HI, klonieren.

Insgesamt wurden vier 3'-Klone von HTC₂ isoliert und weiterverwendet: pHTC₂ CAT 3'+ und pHTC₂ CAT 3'- enthielten je eine Kopie des zellulären Aktivatorelements am 3'-Ende des CAT-Gens in beiden Orientierungen - wie bei HTC₁ (Abb. 23).

In pHTC₂ CAT 3'd (doppelt) war die Tandemintegration des Hind III/Pvu II-Fragments (enthalten in einem Bam HI-Fragment) an das 3'-Ende des CAT-Gens kloniert worden, und zwar in + Orientierung (Abb. 23).

In pHTC₂ CAT 3'dd (doppelt-doppelt) waren zwei Bam HI-Fragmente and das 3'-Ende des CAT-Gens kloniert worden, von denen jedes wiederum die Tandemintegration des Hind III/Pvu II-Fragments trug, so daß letztendlich vier HTC₂-Elemente in der 3'-Konfiguration vorlagen (Abb. 23).

Die Orientierungen der Inserts dieser Klone wurde durch Restriktionsverdaus mit Bam HI, Hind III, Kpn I und Bgl I überprüft.

Abb. 23 zeigt die Anordnung der HTC-Elemente in allen CAT-Klonen.

Mit diesen Konstrukten sollte auch ein eventueller Einfluß der Kopienzahl der zellulären Sequenzen auf die Promotoraktivierung untersucht werden.

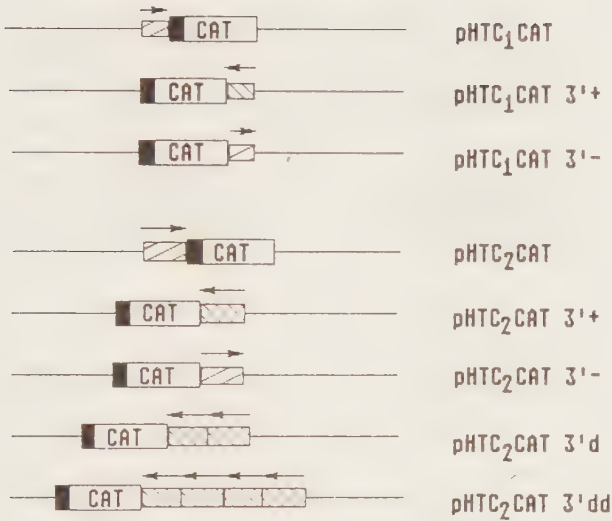


Abb. 23: Struktur der 3'-Klone von HTC₁ und HTC₂
 schraffierte Balken: HTC-Elemente
 ausgefüllter Balken: defekter Promotor

4.14.2. CAT-Aktivitätstests der 3'-Klone von HTC₁ und HTC₂

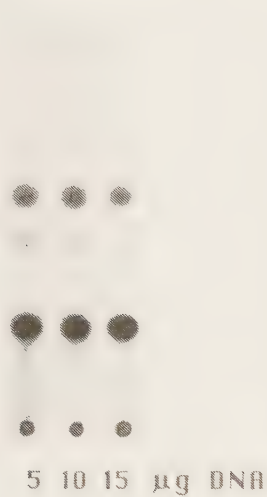
Mit den in 4.14.1. beschriebenen CAT-Konstrukten (5, 10, 15 µg) wurden wieder BHK-Zellen transfiziert und die Proteinextrakte (250 µg) nach 48 h für CAT-Aktivitätstests verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen Abb. 24 und Abb. 25.

Zunächst zu den Aktivitätswerten der 3'-Klone von HTC₁ (Abb. 24):

pHTC₁CAT 3'+ zeigte einen leichten Aktivitätsverlust gegenüber pHTC₁CAT, der im Durchschnitt (8 Transfektionen) jedoch nicht mehr als ca. 15% betrug. Das heißt, HTC₁ wirkte am 3'-Ende des Gens fast ebenso stimulierend auf den Promotor wie am 5'-Ende, also in unmittelbarer Nachbarschaft zu diesem (Abb. 24a und b).

Bei umgekehrter Orientierung des Aktivatorelements wie in pHTC₁CAT 3'- war ein deutlicherer Aktivitätsabfall zu beobachten. Jedoch lag die Stärke des Promotors noch immer über der des defekten Promotors ohne das zelluläre Element in pSV8CAT (Abb. 24a und b).

pdSV8CAT



pSV2CAT

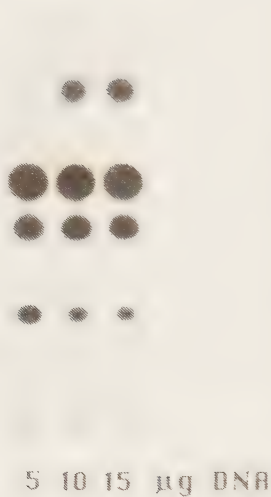
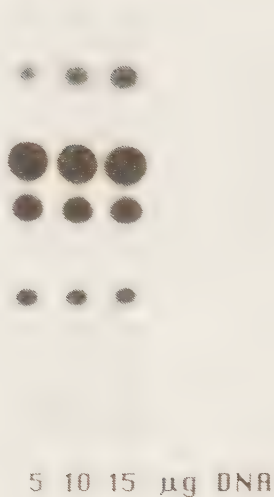
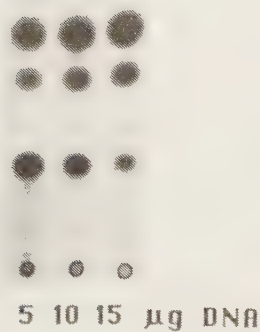
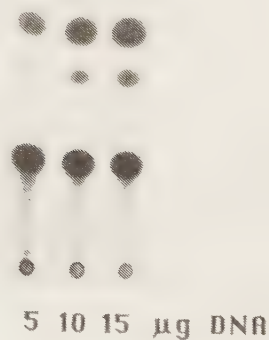
pHTC₁CATpHTC₁CAT 3'+pHTC₁CAT 3'-

Abb. 24a: CAT-Aktivitätstests der 3'-Klone von HTC₁

BHK-Zellen wurden mit 5, 10 und 15 µg DNA der jeweiligen Plasmide transfiziert. Die Proteinextrakte wurden mit ¹⁴C-Chloramphenicol und Acetyl-Coenzym A inkubiert (1 h) und die acetylierten Produkte wurden chromatographisch aufgetrennt (nähere Erläuterungen siehe auch Abb. 4a).

Die acetylierten Produkte wurden in einem Berthold Scintillationszähler gezählt und das Ergebnis ist in Abb. 24b dargestellt.

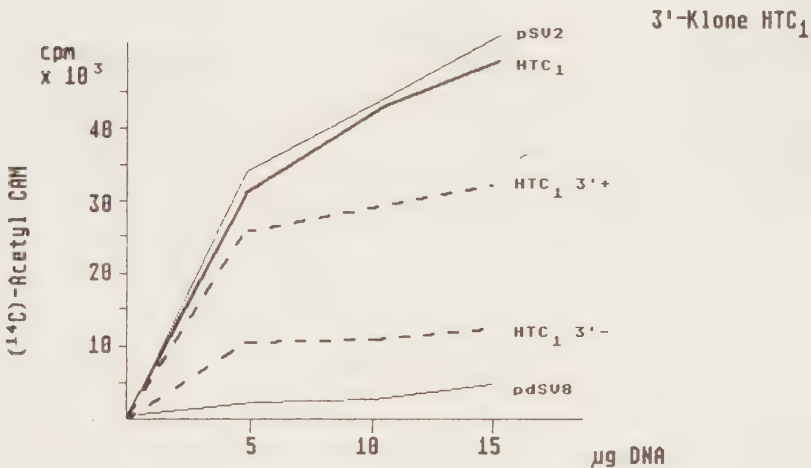


Abb. 24b: Radioaktivitätsmessungen der acetylierten Formen des Chloramphenicols (siehe Abb. 24a).

Aufgetragen sind die Zerfälle pro Minute (y-Achse) gegen die transfizierte Menge DNA der jeweiligen Plasmide (x-Achse).

Hieraus konnte man ersehen, daß HTC₁ sehr wohl Eigenschaften eines Enhancers aufwies, jedoch nicht völlig orientierungsunabhängig wirkte.

Bei den Aktivitätsmessungen der 3'-Klone von HTC₂ (Abb. 25) ergab sich folgendes Bild:

pdSV8CAT

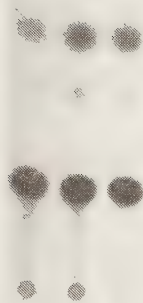
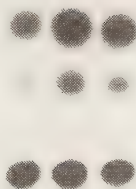
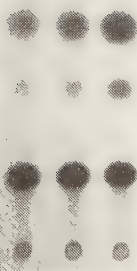
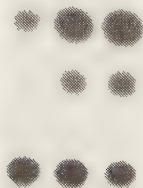
5 10 15 μ g DNApHTC₂CAT5 10 15 μ g DNApHTC₂CAT 3'+5 10 15 μ g DNApHTC₂CAT 3'-5 10 15 μ g DNApHTC₂CAT 3'd5 10 15 μ g DNApHTC₂CAT 3'dd5 10 15 μ g DNA

Abb. 25a: CAT-Aktivitätstests der 3'-Klone von HTC₂

BHK-Zellen wurden mit 5, 10 und 15 µg DNA der jeweiligen Plasmide transfiziert. Die Proteinextrakte wurden mit ¹⁴C-Chloramphenicol und Acetyl-Coenzym A inkubiert (1 h) und die acetylierten Produkte wurden chromatographisch aufgetrennt (nähere Erläuterungen siehe auch Abb. 4a).

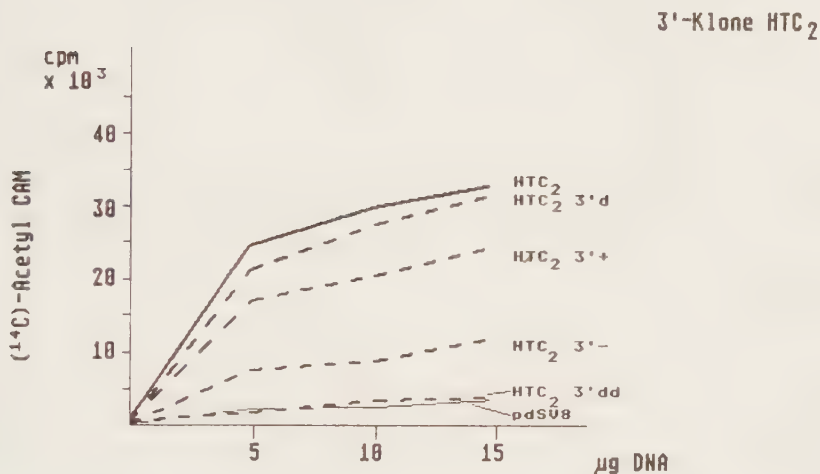


Abb. 25b: Radioaktivitätsmessungen der acetylierten Formen des Chloramphenicols (siehe Abb. 25a).

Aufgetragen sind die Zerfälle pro Minute (y-Achse) gegen die transfizierte Menge DNA der jeweiligen Plasmide (x-Achse).

pHTC₂CAT 3'+ zeigte eine geringfügig niedrigere CAT-Aktivität als der 5'-Klon (pHTC₂CAT). Auch hier zeigte der Klon mit der entgegengesetzten Orientierung des zellulären Teils (pHTC₂CAT 3'-) deutlich weniger Promotoraktivierung als der Klon mit der + Orientierung, jedoch lag diese immer noch über der des Kontrollwerts von pdSV8CAT (Abb. 25 a und b).

Eine Verdoppelung der zellulären Sequenz am 3'-Ende wie in pHTC₂CAT 3'd erhöhte die Transkriptionsaktivität leicht im Vergleich zu der Einzelkopie-Insertion (pHTC₂CAT 3'+), so daß in etwa die Werte des 5'-Klons (pHTC₂CAT) erreicht wurden (Abb. 25 a und b).

Bei einer vierfachen Insertion am 3'-Ende (pHTC₂CAT 3'dd) sank die Aktivität jedoch drastisch ab (etwa in den Bereich von pdSV8CAT).

4.14.3. Transfektion von HTC₁ und HTC₂ in verschiedene Zelllinien und Test der Promotoraktivität

Ein nächster zu untersuchender Punkt war die mögliche Zellspezifität der beiden Transkriptionskontrollelemente.

Um dies zu klären, wurden CAT-Klone von HTC₁ und HTC₂ in HeLa-Zellen und in TC7-Zellen transfiziert. Ebenso wurden L-Zellen getestet, um einen eventuellen Unterschied von Epithel- zu Fibroblastenzellen aufzuzeigen.

Epithelzellen: BHK-Zellen, TC7-Zellen, HeLa-Zellen

Fibroblasten: L-Zellen

Abb. 26-28 zeigen wiederum transiente Expressionstests mit pHTC₁CAT und pHTC₂CAT sowie den 3'-Klonen pHTC₁CAT 3' und pHTC₂CAT 3'.

Für die quantitative Analyse wurden die acetylierten Produkte wiederum in einem Scintillationszähler gezählt und die Ergebnisse anschließend graphisch dargestellt.

Bei pHTC₁CAT sah man sowohl in HeLa-Zellen (Abb.26) als auch in TC7-Zellen (Abb.27) eine deutliche Steigerung der Transkriptionsaktivität gegenüber pSV8CAT. Im Vergleich zu BHK Zellen war die promotoraktivierende Wirkung gegenüber dem stets gleich aktiven SV40 Wildtyp-Promotor leicht herabgesetzt. Der 3'-Klon von HTC₁ (pHTC₁CAT 3') zeigte keinerlei Stimulation des defekten Promotors.

Dies könnte bedeuten, daß HTC₁ in diesen Zellen zwar noch transkriptionsaktivierend wirkt, jedoch seine Enhancereigenschaften verloren hat.

Im Gegensatz dazu zeigten pHTC₂CAT und pHTC₂CAT 3' in keiner dieser Zellen irgendeine Stimulation der Transkription.

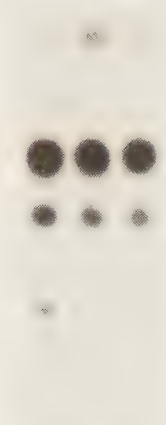
Allgemein war die Expression des CAT-Gens in HeLa-Zellen deutlich höher als in TC7-Zellen.

pdsV8CAT

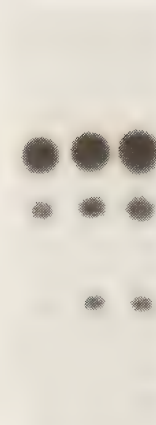


5 10 15 µg DNA

pSV2CAT



5 10 15 µg DNA

pHTC₁CAT

5 10 15 µg DNA

pHTC₂CAT

5 10 15 µg DNA

pHTC₁CAT 3'+

5 10 15 µg DNA

pHTC₂CAT 3'+

5 10 15 µg DNA

Abb. 26a: CAT-Aktivitätstests von HTC₁ und HTC₂ in HeLa-Zellen
 HeLa-Zellen wurden mit 5, 10 und 15 µg DNA der jeweiligen Plasmide transfiziert. Die Proteinextrakte wurden mit ¹⁴C-Chloramphenicol und Acetyl-Coenzym A inkubiert (1 h) und die acetylierten Produkte wurden chromatographisch aufgetrennt (nähere Erläuterungen siehe auch Abb. 4a).

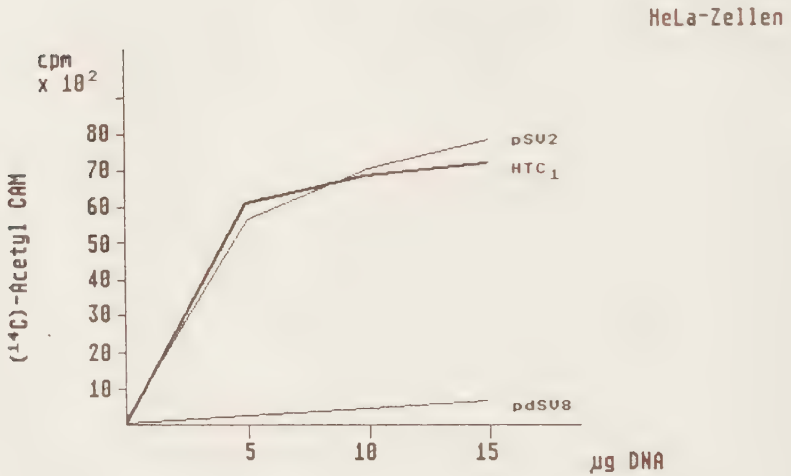
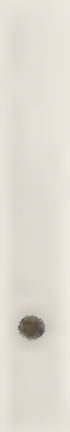


Abb. 26b: Radioaktivitätsmessungen der acetylierten Formen des Chloramphenicols (siehe Abb. 26a).
 Aufgetragen sind die Zerfälle pro Minute (y-Achse) gegen die transfizierte Menge DNA der jeweiligen Plasmide (x-Achse).

pdsU8CAT

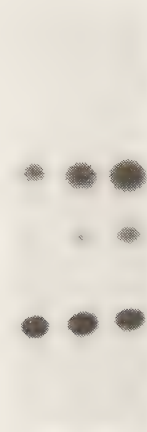


15 µg DNA

pSU2CAT



5 10 15 µg DNA

pHTC₁CAT

5 10 15 µg DNA

pHTC₂CAT

5 10 15 µg DNA

pHTC₁CAT 3'+

5 10 15 µg DNA

pHTC₂CAT 3'+

5 10 15 µg DNA

Abb. 27a: CAT-Aktivitätstests von HTC₁ und HTC₂ in TC7-Zellen
 TC7-Zellen wurden mit 5, 10 und 15 µg DNA der jeweiligen Plasmide transfiziert. Die Proteinextrakte wurden mit ¹⁴C-Chloramphenicol und Acetyl-Coenzym A inkubiert (1 h) und die acetylierten Produkte wurden chromatographisch aufgetrennt (nähere Erläuterungen siehe auch Abb. 4a).

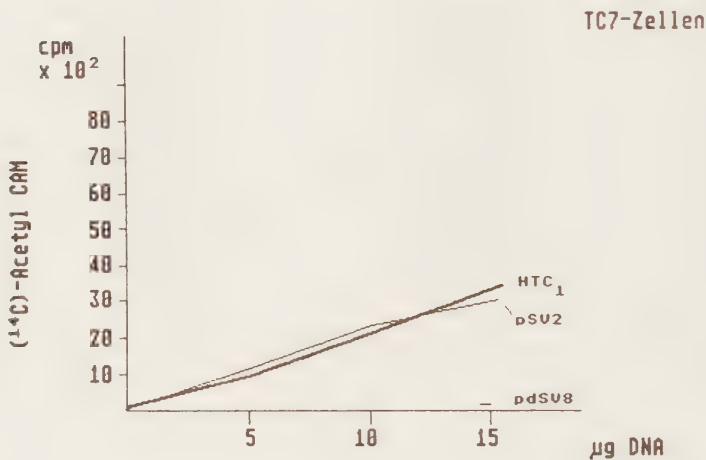


Abb. 27b: Radioaktivitätsmessungen der acetylierten Formen des Chloramphenicols (siehe Abb. 27a).

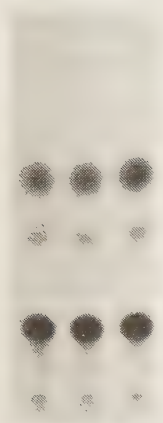
Aufgetragen sind die Zerfälle pro Minute (y-Achse) gegen die transfizierte Menge DNA der jeweiligen Plasmide (x-Achse).

Eine veränderte Situation war in L-Zellen (Abb.28) anzutreffen.

Hier konnte gezeigt werden, daß pHTC₁CAT nur eine sehr geringe stimulierende Wirkung auf den Promotor ausübte, während bei pHTC₂CAT die Aktivierung deutlicher zu erkennen war. Die gleiche Aussage traf auf die 3'-Klone pHTC₁CAT 3' und pHTC₂CAT 3' zu.

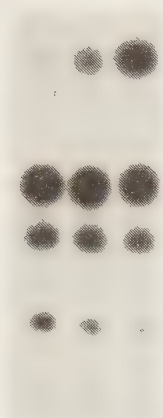
Somit stellte sich in den Fibroblasten-Zellen eine umgekehrte Situation wie bei den epithelialen Zellen ein.

pDSU8CAT

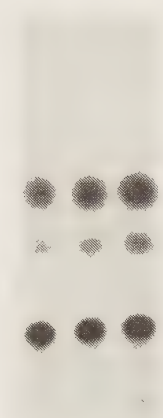


5 10 15 µg DNA

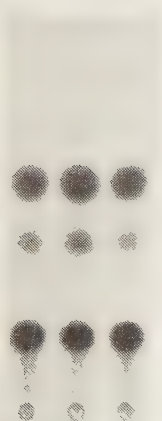
pSU2CAT



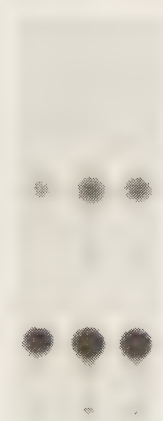
5 10 15 µg DNA

pHTC₁CAT

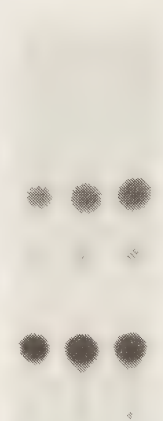
5 10 15 µg DNA

pHTC₂CAT

5 10 15 µg DNA

pHTC₁CAT 3'+

5 10 15 µg DNA

pHTC₂CAT 3'+

5 10 15 µg DNA

Abb. 28a: CAT-Aktivitätstests von HTC₁ und HTC₂ in L-Zellen
 L-Zellen wurden mit 5, 10 und 15 µg DNA der jeweiligen Plasmide transfiziert. Die Proteinextrakte wurden mit ¹⁴C-Chloramphenicol und Acetyl-Coenzym A inkubiert (1 h) und die acetylierten Produkte wurden chromatographisch aufgetrennt (nähere Erläuterungen siehe auch Abb. 4a).

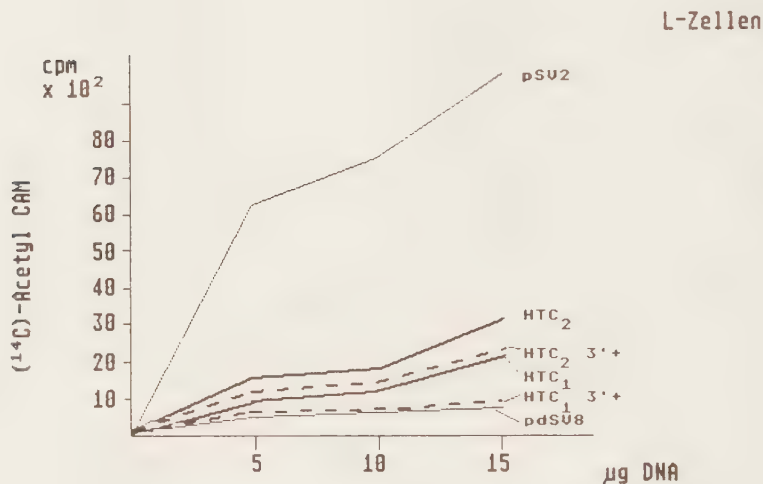


Abb. 28b: Radioaktivitätsmessungen der acetylierten Formen des Chloramphenicols (siehe Abb. 28a).

Aufgetragen sind die Zerfälle pro Minute (y-Achse) gegen die transfizierte Menge DNA der jeweiligen Plasmide (x-Achse).

4.15. Genomische Analyse von HTC₁ und HTC₂

Bisher wurde gezeigt, daß HTC₁ und HTC₂ transkriptionsaktivierende Elemente des Hamstergenoms darstellten, die Enhancereigenschaften aufwiesen und eine Zellspezifität zeigten. Es war von Interesse zu wissen, wie oft und in welcher Form HTC₁ und HTC₂ im Hamstergenom vorlagen, d.h. ob sie zum Regulationsbereich eines bestimmten Gens gehörten oder in größerer Kopienzahl vorlagen und sich somit unter Umständen einer Klasse von Aktivatorelementen zuordnen ließen.

Hierüber sollten genomische Blots Auskunft geben.

Zunächst zu HTC₁ (Abb. 29a):

Jeweils 20 µg genomische BHK-DNA wurden mit Pvu II (Spur 1), Pst I (Spur 2) und Hind III (Spur 3) geschnitten, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter übertragen und mit ³²P-markiertem pUC 12/1 hybridisiert.

Man konnte eine Bande von ca. 3,5 kb in der mit Hind III verdauten DNA erkennen, was bedeutete, daß HTC₁ auf einem 3,5 kb Hind III-Fragment in Einzelkopie (oder in sehr wenigen Kopien) in der BHK-DNA vorlag. Der Verdau mit Pst I erbrachte Banden von ca. 6,4 kb und 1,1 kb Länge, der mit Pvu II Banden von ca. 6,5 kb und 1,7 kb Länge.

In beiden Fällen waren je zwei Banden zu erwarten gewesen, da HTC₁ sowohl eine Pvu II- als auch eine Pst I-Schnittstelle aufweist.

Die Autoradiographie in Abb. 29a stellt eine sehr lange (10 Tage) Exposition des Films dar, so daß die schwachen Hintergrundbanden durch Verunreinigungen zu erklären sind.

Bei HTC₂ ergab sich folgendes Bild (Abb. 29b):

Je 20 µg genomische DNA wurden mit Hae III (Spur 1) und Bam HI (Spur 2) geschnitten. Die auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennten, auf Nitrocellulose transferierten Fragmente wurden mit ³²P-markiertem pUC 12/2 hybridisiert.

Es waren eine Reihe hybridisierender Banden verschiedener Länge und Intensität zu finden, d.h. HTC₂ lag in der BHK-DNA an unterschiedlichen Stellen und dort in unterschiedlicher Häufigkeit vor.

HTC₂ läßt sich somit den "interspersed repetitive elements" zuordnen.

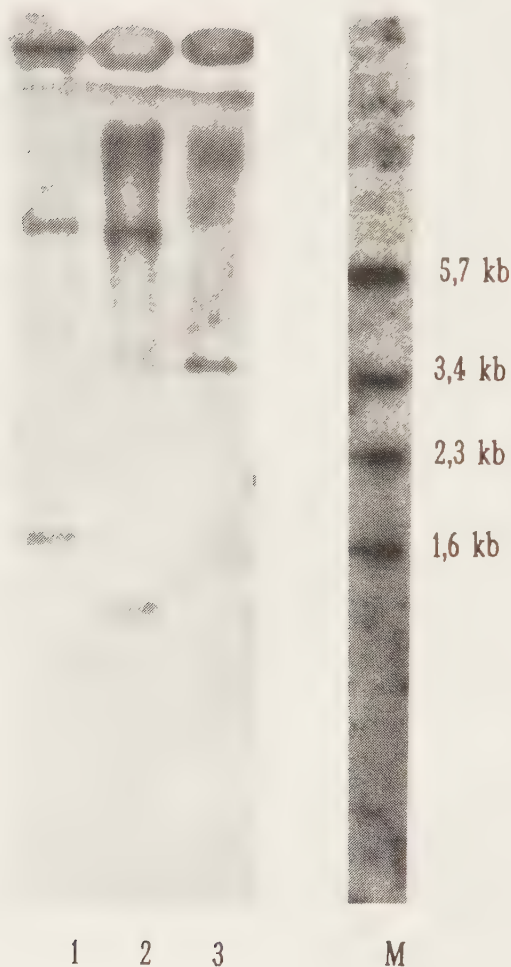


Abb. 29a: Genomische Analyse von HTC₁

Je 20 µg BHK-DNA wurden mit Pvu II (Spur 1), Pst I (Spur 2) und Hind III (Spur 3) verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter transfert und hybridisiert.

Die Hybridisierungsprobe war ³²P-markiertes pUC 12/1.

Marker: siehe Abb. 13a; die 1,6 kb Bande ist ein Fragment aus pAT 153, geschnitten mit Hinf I.

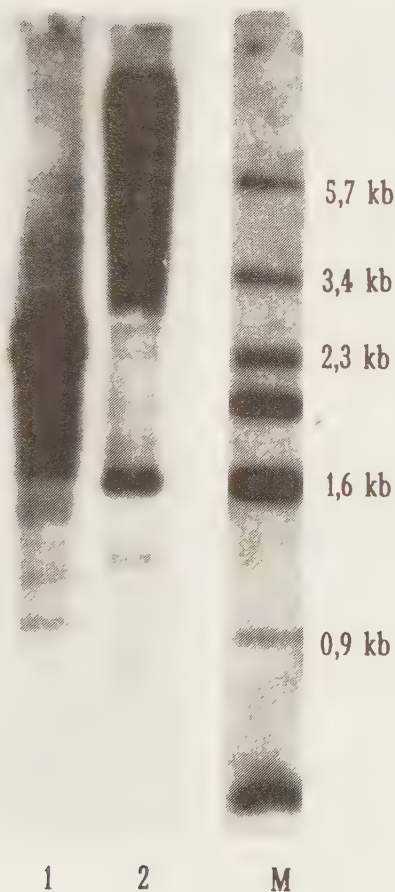


Abb. 29b: Genomische Analyse von HTC₂

Je 20 µg BHK-DNA wurden mit Hae III (Spur 1) und Bam HI (Spur 2) verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt (1% Agarosegel), auf Nitrocellulosefilter transferiert und hybridisiert.

Die Hybridisierungsprobe war ³²P-markiertes pUC 12/2.

Marker: siehe Abb. 29a

4.16. Sequenzierung von HTC₁ und HTC₂

Wie eingangs erwähnt, sind bereits eine Reihe von Enhancermotiven bekannt, sowie allgemein Sequenzbereiche, die Transkriptionsfaktoren an die DNA binden können und somit die Aktivität der RNA-Polymerase II erhöhen.

Um das eventuelle Vorkommen solcher Elemente in HTC₁ und HTC₂ zu untersuchen, wurde eine Sequenzanalyse der beiden zellulären Aktivatoren vorgenommen.

Es wurde nach der in 3.12. beschriebenen Methode der Plasmidsequenzierung vorgegangen. Als Primer diente der für pUC-Plasmide konzipierte reverse Primer 5'-AACAGCTATGACCATG-3'.

In Abb. 30 und Abb. 31 sind die zur Sequenzierung verwendeten Subklone dargestellt.

HTC₁

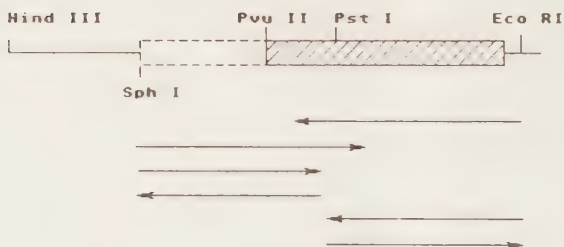


Abb. 30: Zur Sequenzierung verwendete Subklone von HTC₁ und Sequenzierungsstrategie

Die inserierten DNA-Fragmente aus pUC 12/1 sind schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Fragmentlängen und -richtungen der sequenzierten Subklone an.

gestrichelte Linie: Plasmid-DNA

gestrichelt umrahmter Balken: Übergangsbereich von zellulärer DNA zu Plasmid-DNA (exakte Grenze unbekannt)

schraffierter Balken: zelluläre DNA

HTC₁:

pUC 12/1 ; von der Eco RI-Schnittstelle aus ansequenziert

Subklon Sph I/Eco RI (in pUC 19 Sph I/Eco RI); von der Sph I-Schnittstelle aus ansequenziert

Subklon Sph I/Pst I (in pUC 18/19 Sph I/Pst I); in beiden Richtungen

Subklon Pst I/Eco RI (in pUC 18/19 Pst I/Eco RI); in beiden Richtungen

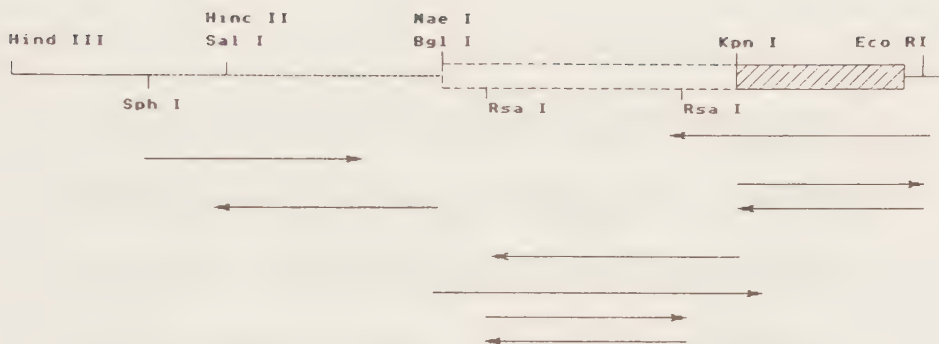
HTC₂

Abb. 31: Zur Sequenzierung verwendete Subklone von HTC₂ und Sequenzierungsstrategie

Die inserierten DNA-Fragmente aus pUC 12/2 sind schematisch dargestellt. Die Pfeile geben die Fragmentlängen und -richtungen der sequenzierten Subklone an.

gestrichelte Linie: Plasmid-DNA

gestrichelt umrahmter Balken: Übergangsbereich von zellulärer DNA zu Plasmid-DNA (exakte Grenze unbekannt)

schraffierter Balken: zelluläre DNA

HTC₂:

pUC 12/2; von der Eco RI-Schnittstelle aus ansequenziert

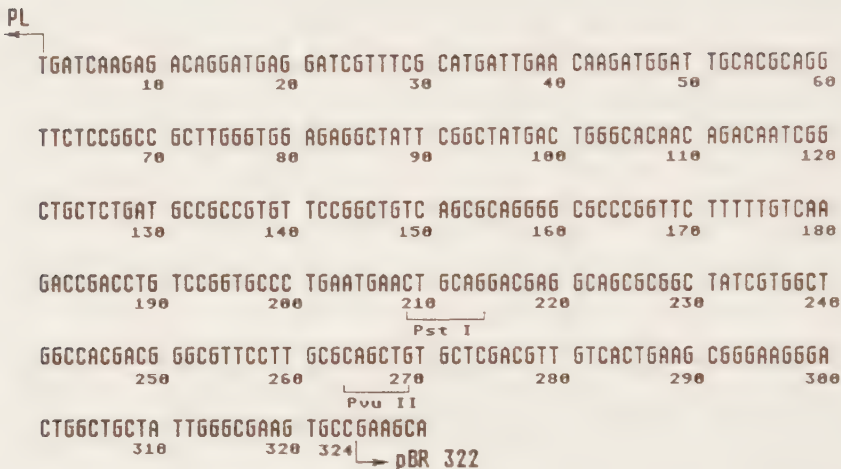
Subklon Sph I/Eco RI (in pUC 19 Sph I/Eco RI); von der Sph I-Schnittstelle aus ansequenziert

Subklon Kpn I/Eco RI (in pUC 18/19 Kpn I/Eco RI); in beiden Richtungen

Subklon Sph I/Mae I (in pUC 18 Sph I/Hinc II); von der Mae I-Schnittstelle aus ansequenziert

Subklon Kpn I/Mae I (in pUC 18/19 Kpn I/Hinc II); in beiden Richtungen

Subklon Rsa I (in pUC 18/19 Hinc II); in beiden Richtungen

4.17. Sequenzen von HTC₁ und HTC₂HTC₁:Abb. 32: Sequenz von HTC₁

PL: Polylinker von pUC 18 bzw. pUC 19

pBR 322: Übergang zur Plasmid-DNA von pSV8neo

Die Plasmid-DNA begann bei Pos. 621 (pBR 322-Koordinaten) und endete bei der Sph I-Schnittstelle des defekten Promotors (Pos. 562; pBR 322-Koordinaten). Die Länge des Plasmidanteils zwischen zellulärer DNA und defektem Promotor betrug somit 59 bp, die Länge der zellulären Insertion 324 bp.

HTC₂:

PL
 TGGAAAGGGA CAATTGGTG ATTCAGAGA AAATTGTGCA GAGAAAGTG GTGTGGTTAG
 10 20 30 40 50 60
 AATGGATGC AAGAGTTTTG ACGGGGCTAA CCTGTCAAAA ACCTCCAGAA GTGACGAAGT
 70 80 90 100 110 120
 AGGACCACTG ATTGATGGCT AGGGAGATGG CTCAGTCAGC AAGTATCTT CTGTGAAGC
 130 140 150 160 170 180
 GTGGGTACCC TGAATTTGAT CCCCCAAACC AATCTGAATA TAGTACCTGG TAGGTACAT
 190 200 210 220 230 240
 Kpn I
 TAAAAACCC TTAGTACTGC GCCGGAGCTC CCTGGGGCTC ATCAGCCAGG GAGCCAAGTC
 250 260 270 280 290 300
 TGACCTGGGA GCCCCAGTTA ATTTCTTTCT TTAAGTTTC AATGTTCTG CGATACAGT
 310 320 330 340 350 360
 CTTTACTTG TTTGGTTAGC GTTACCCCA GGAATTTTAT GTTGTGTTG GCCATTGAGT
 370 380 390 400 410 420
 TTCCTCTTTC AAACAGAAAT CAGTTTTTA ACAAAATTAC ACTTCTTTTC TGAATCGCTC
 430 440 450 460 469 → pBR 322

Abb. 33a: Sequenz von HTC₂

PL: Polylinker von pUC 18 bzw. pUC 19

pBR 322: Übergang zur Plasmid-DNA von pdSV8neo

Die Plasmid-DNA begann bei Pos. 2373 (pBR 322-Koordinaten) und lief in Gegenstrangrichtung bis Pos. 2405. Dann wurde in 5'-Richtung weitergelesen ab Pos. 2355 (Deletion zwischen Pos. 2355 und 2373) bis zur Nru I/Sma I-Ligationsstelle (siehe 4.2.) bei Pos. 2246. Bis zur Sph I-Schnittstelle des defekten Promotors (Pos. 562) lagen weitere 410 bp Plasmidsequenz (siehe Abb. 33b). Die Länge des Plasmidanteils betrug somit ca. 550 bp, die Länge der zellulären Insertion 469 bp.

Abb. 33b zeigt eine schematische Darstellung des Plasmidanteils am 3'-Ende von HTC₂



Abb. 33b: Darstellung der Rekombination im Plasmidanteil angrenzend an die zellulären Sequenzen von HTC₂
gestrichelte Linie: Plasmid-DNA

4.17. Sequenzvergleichsanalysen

Bei allen dargestellten Sequenzen bedeuten * eine inkorrekte Basenpaarung und + ein überzähliges Nukleotid.

HTC₁:

Die Sequenz von HTC₁ wies einen sehr hohen Anteil des in eukaryotischer DNA unterrepräsentierten Dinukleotids CG auf (Bird, 1987). Es waren in einer Gesamtlänge von 324 Nukleotiden 27 CG-Paare vorhanden.

Weiterhin zeigten die Basen von Pos. 131 - 145 Homologie zu einer pBR 322-Sequenz (Pos. 2264 - 2278).

Sequenzhomologien zu bekannten Elementen und andere Besonderheiten:

1. Inverse Repetitionen:

```

      →                ←
AGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCT
58**          **          87

```

```

      →                ←
ACCGACCGTGGCCGGT
182          + 196

```

```

      →                ←
TCGTGGCTGGCCACGA
233          248

```

2. Homologien zur Enhancer core Sequenz:

^{AAA}
 GTGG G
^{TTT}
 *
 GTGGAGAG
 77 84
 *
 ATGGATTG
 45 52

Konsensussequenz der Enhancer-core-Region
 von SV40
 (Weiher et al., 1983)

3. Homologie zum E1A - Enhancer

^A ^A
 GGAAGTGA
^C ^C
 * *
 GGAAGGAC
 293 301

Konsensussequenz der E1A-Enhancer-core-Region
 (Hearing & Shenk, 1983)

4. Invertierte CCAAT - Box:

←
 ATTGG
 310 314

(Jones et al., 1985;
 Graves et al., 1986)

5. Bindungsstelle für AP 4:

CAGCTGTGG
 CAGCTGTGC
 264 272

(Xiao et al., 1987)

6. Bereiche, die in Z-DNA-Konformation vorliegen können (alternierende Purin/Pyrimidin Basenfolgen):

* * * *
 GCAAGCGGCTATCGTG
 221 237

* *
 TGCACAGCTGTGC
 260 272

Weitere computergestützte Sequenzhomologien zu bekannten Genbereichen finden sich im Anhang.

HTC₂:

Ein sehr häufig vorkommendes Homologieelement aus HTC₂ war die Sequenz: 5'-GAGATGGCTCAGT-3' (siehe Anhang, a-e).

Sequenzhomologien zu bekannten Elementen und andere Besonderheiten

1. Inverse Repetitionen:

TTTTGACGGGGGCTAACCTGTCAAAA
76 * 100

TATAGTACCTGGTAGTGTA
218 * * 237

TCCCTGGGGCTCATCAGCCAGGGGA
268 ** * 292

CTTTAAAG
328 336

TTCCTCTTTCAACAGAAA
421 * * 439

2. Homologien zur Enhancer core Sequenz:

AAA
GTGG TTT

GTGGTGTG
48 * 55

Konsensussequenz der Enhancer-core-Region
von SV40
(Weiher et al., 1983)

GTGGTTAG
53 60

3. Homologie zum E1A - Enhancer:

A GGAAGTGA A
C C

Konsensussequenz der E1A-Enhancer-core-Region
(Hearing & Shenk, 1983)

* CAGAAGTGA C
106 115

4. CCAAT - Box und invertierte CCAAT - Box:

→
CCAAT
208 212

(Graves et al., 1986; Jones et al., 1985)

←
ATTGG
14 18

5. Bindungsstellen für AP1, AP2, AP5:

AP1: C TGACT A
G A

AP2: CCCAGGC

AP5: CTGTGGA

* CTGACTCG
470 477

*** CCCAGTT
312 319

* CTGTGGA
171 178

(Lee et al., 1987;
Piette & Yaniv, 1987)

(Mitchell et al., 1987;
Imagawa et al., 1987)

(Kovedesi et al., 1987)

6. Bereich, der in Z-DNA-Konformation vorliegen kann (alternierende Purin/Pyrimidin-Basenfolge):

* *** *
ATATAGTACCTGGTAGTGTACAT
218 240

Weitere computergestützte Sequenzhomologien zu bekannten Genbereichen finden sich im Anhang.

4.18. Genbank der BHK-Zelllinie

Nachdem es somit gelungen war, Elemente mit Enhancereigenschaften aus der BHK-DNA zu isolieren, stellte sich die Frage nach den Genen, die im Hamstergenom von diesen Sequenzen kontrolliert werden. Es sollte versucht werden, die den Aktivatorsequenzen benachbarten und eventuell von diesen beeinflussten Sequenzbereiche zu isolieren.

Hierzu wurde eine genomische Bank von BHK-DNA angelegt.

400 μg BHK-DNA wurden mit Mbo I partiell verdaut, über einen Cäsiumchlorid-Gradienten aufgetrennt (3.11.2) und DNA-Fragmente des Größenbereichs von 12 kb - 20 kb wurden weiter verwendet.

Von dem Phagen λ EMBL 3A⁺ (Abb. 34) wurden von 30 μg DNA die Arme präpariert (3.11.1). Der λ -Phage EMBL 3A⁺ ist eine nicht näher charakterisierte, besser wachsende Mutante des Phagen EMBL 3A mit einem invers angeordneten Polylinkersystem (Abb. 34), aus dem sich inserierte Fragmente leicht wieder heraus schneiden lassen.

In drei verschiedenen Ligationsansätzen wurden je 5 μg gereinigte Phagenarme mit 2,5 μg DNA-Fragmenten des Mbo I-Verdaus vereinigt und davon insgesamt sechs Ansätze *in vitro* verpackt (3.11.4., 3.11.5.).

Die Ausbeute an rekombinanten Phagen betrug $1,7 \times 10^6$.

Um eine Amplifikation der Genbank zu erreichen (3.11.6.) wurden $1,1 \times 10^6$ pfu auf E. coli K803 vermehrt, die Phagenausbeuten anschließend vereinigt und in Aliquots bei -80° eingefroren.

Die Qualität der Genbank wurde überprüft, indem 5×10^4 pfu ausplattiert wurden und mit einem Oligonukleotid nach dem Gen für die 4,5 S RNA durchgemustert wurden (Kruczek et al., zu Veröffentlichung eingereicht; Stabel & Doerfler, 1982). Dieses Gen liegt im Hamstergenom auf einer ca. 300fach vorkommenden 4 kb Repetition. Somit wären in 5×10^4 Phagenplaques ungefähr 15 positive Klone zu erwarten gewesen.

Es wurden 16 hybridisierende Klone gefunden, so daß man davon ausgehen konnte, daß die Genbank das Hamstergenom vollständig repräsentierte.

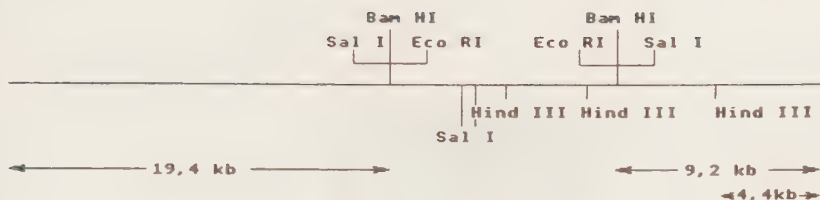


Abb. 34: Schematische Darstellung des λ -Phagen EMBL 3A⁺

Der Phage enthält zwei Arme von 19,4 kb und 9,2 kb Länge, sowie einen Mittelteil, der beim Klonieren herausgeschnitten wird. Dieser Mittelteil wird von Polylinkerregionen auf beiden Seiten eingegrenzt. Nach einem Verdau mit Bam HI und Eco RI kann das Mittelstück nicht in den Phagen zurückligieren, sondern nur DNA-Fragmente z.B. aus partiellen Verdau mit Sau 3A oder Mbo I geeigneter Größe (> 14 kb) können eingebaut werden. Insert-Fragmente können anschließend mit Sal I wieder ausgeschnitten werden.

4.19. Durchmustern der BHK-Genbank mit HTC₁

Da HTC₂ repetitiv im Genom vorlag und somit für die Suche nach benachbarten, kontrollierten Genen ungeeignet erschien, wurde das in Einzelkopie auftretende HTC₁-Element für die Durchsuchung der Genbank verwendet.

5×10^5 pfu wurden auf insgesamt 12 Platten vermehrt und die Filterabzüge wurden mit ³²P-dCTP markiertem pUC 12/1 durchgemustert (3.11.7.).

Nach mehrfachen Reinigungsschritten blieben zwei positive Klone, die ein identisches Restriktionsmuster aufwiesen.

Der Vorgang wurde wiederholt, jedoch zeigten die drei hierbei selektionierten Klone wiederum dieselben Restriktionsfragmente, so daß angenommen wurde, daß es sich um ein und denselben Klon handelte. Dieser wurde $\lambda 1$ genannt und für die weiteren Untersuchungen herangezogen.

So erbrachte ein Verdau mit Sal I, welches das Insertfragment von den Phagenarmen abtrennt, zwei Fragmente von 4,9 kb bzw. ca. 10 kb - 11 kb zusätzlich zu den Armen von 19,4 kb und 9,2 kb (Abb. 35a, Spuren 7 und 8 und Abb. 35b).

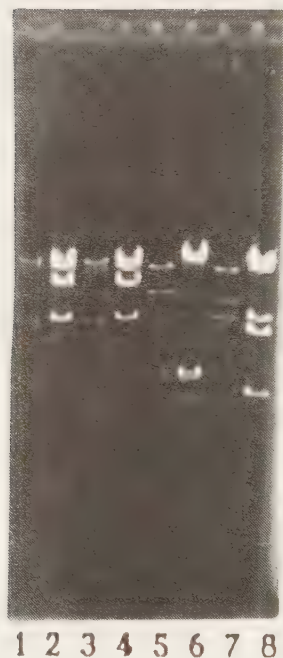


Abb. 35a: Restriktion von λ 1

Je 1 μ g DNA des Klon λ 1 sowie des Phagen EMBL 3A⁺ wurden mit Bam HI (Spuren 1 und 2), Eco RI (Spuren 3 und 4), Hind III (Spuren 5 und 6) und Sal I (Spuren 7 und 8) geschnitten und auf einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt.

Klon λ 1: Spuren 1, 3, 5, 7

EMBL 3A⁺: Spuren 2, 4, 6, 8

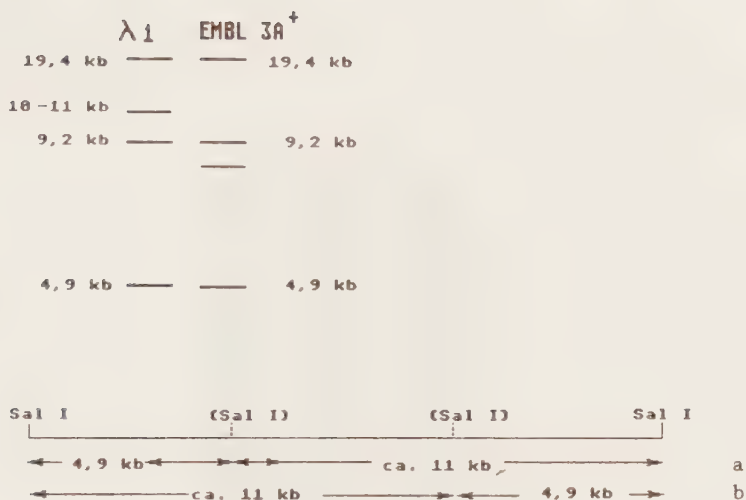


Abb. 35b: Schematische Darstellung der Insertfragmente des Klon $\lambda 1$, die durch einen Verdau mit Sal I entstehen (2 Möglichkeiten a und b).

Ein Verdau mit Hind III (Abb. 35a, Spuren 5. und 6 und Abb. 35c) lieferte (zusätzlich zu einem 4,4 kb Fragment aus dem rechten Arm) ein Fragment von <26 kb, welches aus dem linken Arm plus zusätzlicher inserierter zellulärer DNA bestand. Des weiteren ergaben sich Fragmente von ca. 5,6 kb (Insertfragment) und ca. 12 kb (Insertfragment plus Armteil des rechten Arms).

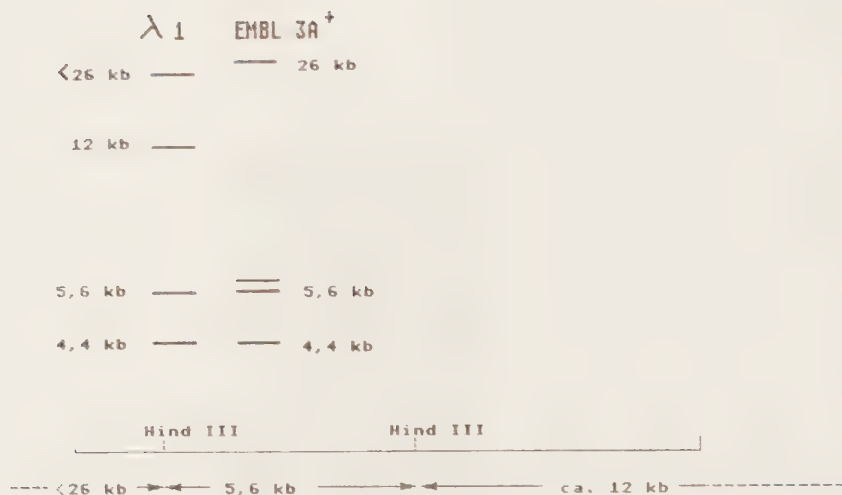


Abb. 35c: Schematische Darstellung Insertfragmente des Klon 31, die durch einen Verdau mit Hind III entstehen.

Restriktionsverdau mit Bam HI (Abb. 35a Spuren 1 und 2) und Eco RI (Abb. 35a Spuren 3 und 4) ergaben jeweils zwei Fragmente, von denen das kleinere eine Länge entsprechend des rechten Phagenarms aufwies. Daraus konnte man folgern, daß am 3'-Ende des Inserts sowohl eine Bam HI-Schnittstelle (eventuell regeneriert aus der Ligation von Mbo I-Fragmenten mit dem Bam HI-Ende des Vektorarms) als auch eine Eco RI-Schnittstelle liegen mußten (siehe auch Abb. 34).

Ein Doppelverdau mit Hind III/Eco RI unterteilte folgerichtig das 12 kb Fragment des Hind III-Verdau (Arm plus zelluläre DNA) in ein 4,9 kb Fragment, welches dem rechten λ -Arm von der Hind III-Stelle bis zur Eco RI-Stelle im Insert entsprach, und ein ca. 7,0 kb - 7,5 kb Eco RI/Hind III-Insert-Fragment (Abb. 36a, Spuren 1 und 2 und Abb. 36b).

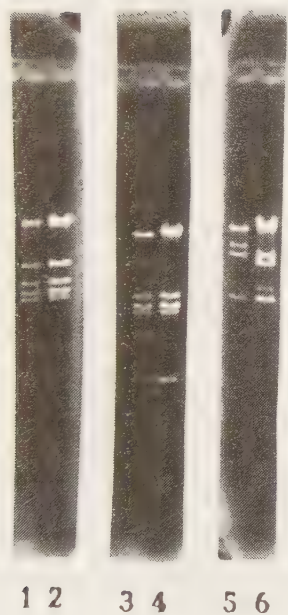


Abb. 36a: Restriktion von λ 1

Je 1 μ g des Klon λ 1 sowie des Phagen EMBL 3A⁺ wurden mit Hind III/Eco RI (Spuren 1 und 2), Hind III/Sal I (Spuren 3 und 4) und Eco RI/Sal I (Spuren 4 und 6) verdaut und auf einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt.

Klon λ 1: Spuren 1, 3, 5

EMBL 3A⁺: Spuren 2, 4, 6

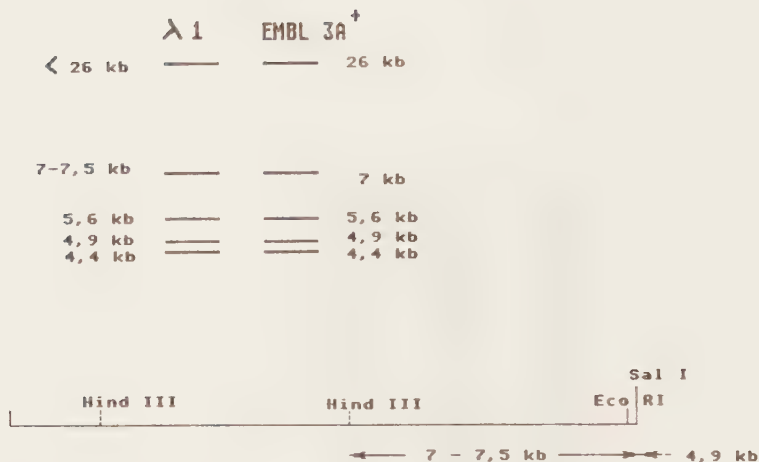


Abb. 36b: Schematische Darstellung der Insertfragmente des Klon $\lambda 1$, die durch den Doppelverdau mit Hind III und Eco RI (Abb. 36a) entstehen.

Ein Doppelverdau mit Hind III/Sal I unterteilte das 7,0 kb - 7,5 kb Hind III/Eco RI-Fragment (bzw. Hind III/Sal I) in ein 4,9 kb Sal I/Sal I-Fragment und ein 2,2 kb Hind III/Sal I-Fragment (damit wurde Möglichkeit b der Anordnung der Fragmente aus dem Sal I-Verdau bestätigt).

Weiterhin wurde am 3'-Ende des Inserts das 10 kb - 11 kb Sal I-Fragment unterteilt in ein 3,0 kb Sal I/Hind III-Fragment und das 5,6 kb Hind III-Fragment (siehe Verdau mit Hind III) sowie das erwähnte 2,2 kb Hind III/Sal I-Fragment (Abb. 36a, Spuren 3 und 4 und Abb. 36c).

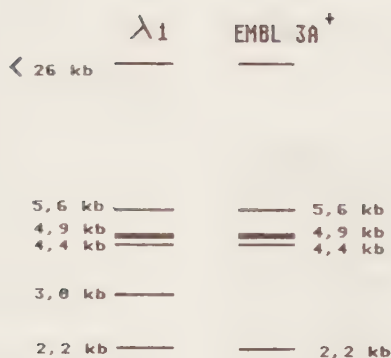


Abb. 36c: Schematische Darstellung der Insertfragmente des Klons $\lambda 1$, die durch den Doppelverdau mit Hind III und Sal I (Abb. 36a) entstehen.

Die Banden des Eco RI/Sal I-Doppelverdaus entsprachen denen des Einzelverdaus mit Sal I, da die Eco RI-Schnittstelle am Ende der Insertion lag, direkt benachbart der Sal I-Schnittstelle (siehe Abb. 35a, Spuren 3 und 4, 7 und 8 sowie Abb. 38).

Abb. 37 zeigt eine auf Grund der vorliegenden Ergebnisse erstellte Restriktionskarte der zellulären Insertionssequenzen von $\lambda 1$.



Abb. 37: Restriktionskarte des Insertfragments des Klons $\lambda 1$

Der nächste Schritt war somit, herauszufinden, wo innerhalb der zellulären Insertion das HTC_1 -Element lokalisiert war.

Eine Hybridisierung des λ -Klons mit pHTC_1 ist in Abb. 38 dargestellt. In dieser Abbildung wurde das Gel aus Abb. 36a hybridisiert mit radioaktiv markiertem HTC_1 .

In dem Hind III/Eco RI-Verdau hybridisiert das große Fragment des linken Arms mit der zusätzlichen Insert-Sequenz (<26 kb, Abb. 38 Spur 1), woraus sich bereits schließen ließ, daß HTC_1 auf dem 3,0 kb Hind III/Sal I-Fragment am linken Ende des Inserts liegen mußte.

Dies wurde bestätigt durch Hybridisierungen mit dem 3,0 kb Fragment des Hind III/Sal I-Doppelverdaus (Abb. 38 Spur 2) und mit dem 10,8 kb Fragment des Eco RI/Sal I-Doppelverdaus (Abb. 38 Spur 3).

Die benachbarten Spuren mit $\text{EMBL } 3\text{A}^+$ hybridisieren nicht mit HTC_1 und ergeben deshalb keine Banden in Abb. 38.

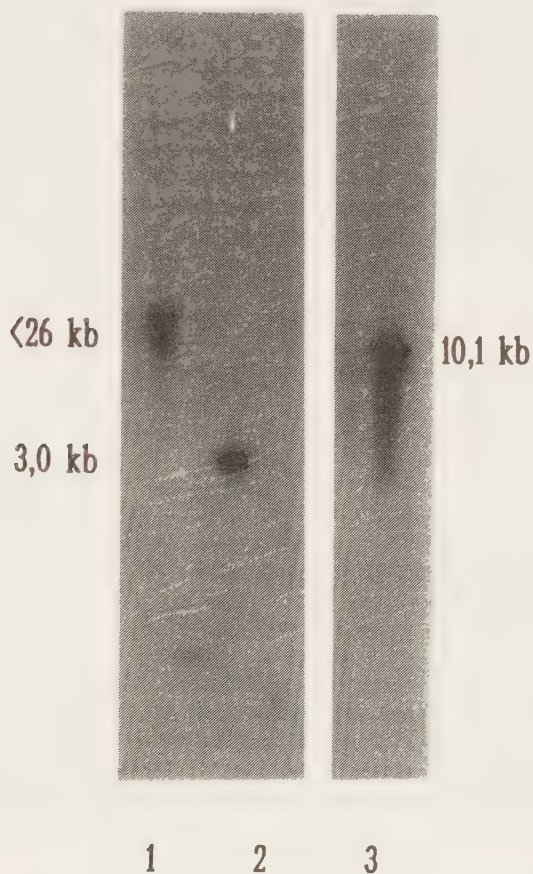


Abb. 38: Das Agarosegel aus Abb. 36a wurde auf Nitrocellulosefilter transferiert und mit ^{32}P -markiertem HTC_1 (pUC 12/1) hybridisiert. Spur 1 zeigt das hybridisierende Fragment von <26 kb Länge des Hind III/Eco RI-Verdau. In Spur 2 hybridisiert das 3,0 kb Fragment aus dem Hind III/Sal I-Verdau und Spur 3 zeigt das hybridisierende 10,8 kb Fragment aus dem Sal I/Eco RI-Verdau.

Dieses 3,0 kb Hind III/Sal I Fragment wurde in pUC 12 (geschnitten mit Hind III und Sal I) kloniert und weiteren Restriktionen unterworfen.

So ergab ein Doppelverdau mit Hind III/Pvu II nur die pUC-Fragmente von 2,6 kb und 90 bp und das ungeschnittene 3,0 kb Fragment aus dem λ -Klon (ohne Abb.). Daraus wurde geschlossen, daß die Pvu II-Schnittstelle von HTC₁ nicht mehr auf dem Insert des λ -Klons lag.

Dies wurde bestätigt durch einen Verdau mit Hind III, Pvu II und Pst I. Zusätzlich ergab sich ein ca. 220 bp Fragment, welches durch eine Pst I-Schnittstelle ca. 20 bp von der Sal I-Schnittstelle entfernt und die Pvu II-Schnittstelle aus pUC 12 entstanden war (ohne Abb.).

Eine schematische Darstellung der Restriktionsfragmente, die aus den Verdaus mit den genannten Enzymen entstanden, zeigt Abb. 39.

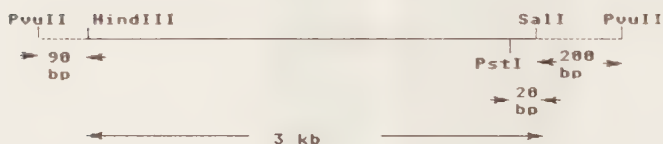


Abb. 39: Schematische Darstellung der Lage der Pst I-Schnittstellen auf dem 3 kb Hind III/Sal I-Fragment des Klonen λ 1
gestrichelte Linie: Plasmid-DNA

Es wurde daraufhin der Versuch unternommen, die BHK-Genbank mit dem das 3,0 kb Hind III/Sal I-Fragment enthaltenden pUC 12-Klon zu durchsuchen. Dieses "chromosomal walking" erbrachte zwei positive Klone, die sich jedoch aufgrund einer Restriktionsanalyse wiederum als identisch mit λ 1 erwiesen. Es bestand somit die Möglichkeit einer Unterrepräsentanz des gesuchten Genabschnitts in der vorliegenden BHK-Bank.

Nachdem in den CAT-Aktivitätstests mit den 3'-Klonen von HTC₁ eine Richtungsabhängigkeit von HTC₁ beobachtet wurde, war zu vermuten, daß das unter der Kontrolle von HTC₁ stehende Gen im 5'-Bereich des 3,0 kb Hind III/Sal I-Fragments zu finden war und somit nicht mehr auf der zellulären Insertion des λ 1-Klons lag.

Dies wurde ebenso angedeutet durch Hybridisierungsexperimente von BHK-Gesamt RNA sowie BHK-Poly A-RNA mit dem das 3,0 kb Hind III/Sal I Fragment enthaltenden pUC 12 Klon. Es wurden keine positiven Signale erhalten (ohne Abb.), woraus man unter Vorbehalt (keine positive Kontrolle) folgern konnte, daß auf dem 3,0 kb Hind III/Sal I-Fragment keine mRNA kodiert war. Der gleiche Versuch wurde mit dem 5,6 kb Hind III-Fragment aus 71 wiederholt. Auch in diesem Fragment konnte keine mRNA lokalisiert werden.

5. DISKUSSION

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode der Expressionsselektion mit nachfolgender Amplifikation stellt einen relativ einfachen Weg zur Isolierung zellulärer Transkriptionsaktivatoren dar.

1. Transfektionsrunde

Zunächst wurden BHK-Zellen mit einem Resistenzplasmid, dessen Antibiotika-Resistenzen unter der Kontrolle eines Enhancer-defekten SV40-Promotors stand, transfiziert. Es wurden relativ undifferenzierte Zellen wie BHK-Zellen verwendet, da in solchen Zellen die meisten Regulationselemente noch nicht abgeschaltet sind, wie dies in ausdifferenzierten Zellen der Fall ist. In letzteren werden meist nur noch bestimmte Proteine synthetisiert und damit kontrolliert exprimiert. Zudem bieten undifferenzierte Zellen die Möglichkeit, Kontrollelemente, die beim Differenzierungsprozeß selbst eine Rolle spielen, zu isolieren.

Die strikte Enhancer-Abhängigkeit des SV40-Promotors (Berg et al., 1984) bestätigte sich, wie in den transienten Expressionstests von pdSV8CAT gezeigt werden konnte. Somit stellte der defekte Promotor von pdSV8 ein geeignetes Selektionssystem dar. Auch erwies sich das in den Transfektionen verwendete Neomycin-Resistenzgen als zuverlässiger Selektionsmarker. Es wurden keine Zellklone mit Spontanresistenzen gefunden, wie das bei Zellen, die mit Chloramphenicol-Resistenzgenen transfiziert wurden, der Fall war.

Die Integration von Fremd-DNA in das Genom einer eukaryotischen Zelle erfolgt im allgemeinen in sequenzunspezifischer Weise. Versuche, mit L-Zellen der Maus haben jedoch gezeigt, daß mit Hilfe der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode in diese Zellen eingebrachte DNA bevorzugt in repetitive Elemente eingebaut wird (Kato et al., 1986). Versuche dieser Art wurden bisher in Hamsterzellen nicht durchgeführt. Wenn jedoch ähnliche Bedingungen vorlägen, so könnte dies ein Grund für das Auffinden von HTC_2 , eines "interspersed repetitive element", sein. Genauso könnte die Isolierung von HTC_2 aber auch zufälliger Natur sein und nur durch das gehäufte Auftreten repetitiver DNA im Genom bedingt sein (siehe auch Drescher et al., 1987).

Es stellte sich auch die Frage nach den Folgen der Integration von Plasmid-DNA - besonders bei multiplen Insertionen wie nach der 1. Transfektionsrunde - für den Zustand einer Zelle. Durch den Insertionsprozeß sind Ereignisse wie die dadurch hervorgerufene Zerstörung eines essentiellen Gens möglich. Dies resultiert aller Wahrscheinlichkeit nach in nicht lebensfähigen Zellen. Ebenso wäre möglich, daß die Kontrollregion eines Gens funktionsunfähig wird und ein

bestimmtes Gen daraufhin abgeschaltet oder überexprimiert wird, was in den meisten Fällen ebenfalls zum Absterben der Zellen führt. Weiterhin wäre denkbar, daß ein zellulärer Aktivator durch die Integration von Fremd-DNA in seiner Funktion für das "richtige" Gen nicht beeinflusst wird und sowohl den defekten Promotor des Resistenzplasmids wie auch den des zugehörigen Gens stimuliert (siehe auch Hamada, 1986a), oder daß das zweite Chromosom den Ausfall eines Aktivatorelements kompensieren kann. Schließlich kann es auch sein, daß bestimmte Gene in BHK-Zellen noch nicht oder nicht mehr aktiv sind und somit der Ausfall zugehöriger Transaktivatoren ohne Folgen bleibt. Bei den multiplen Insertionen der Plasmid-DNA nach der 1. Transfektionsrunde kann man wohl davon ausgehen, daß ein Großteil der Insertionen in nicht-essentielle Bereiche erfolgt ist.

Die multiplen Insertionen des neo-Gens nach der 1. Transfektionsrunde ließen eine gezielte Klonierung eines zellulären Aktivatorelements nicht zu, da nicht bekannt war, welches der neo-Gene aktiv transkribiert wurde und welches nur "still" integriert war. Es war ebenso möglich, daß in einigen Fällen mehr als ein integriertes neo-Gen transkriptionsaktiv war. Die im Gegensatz zu Klonen der 2. Transfektionsrunde gleichmäßige Wachstumsgeschwindigkeit und Stärke der neospezifischen RNA könnte dadurch erklärt werden, daß bei einzelnen Klonen der 1. Transfektionsrunde mehr als ein neo-Gen transkribiert wurde - vielleicht auch nur in geringem Maße - was aber in der Gesamtheit für den Aufbau der Resistenz ausreichte (Yoshimura & Chaffin, 1987).

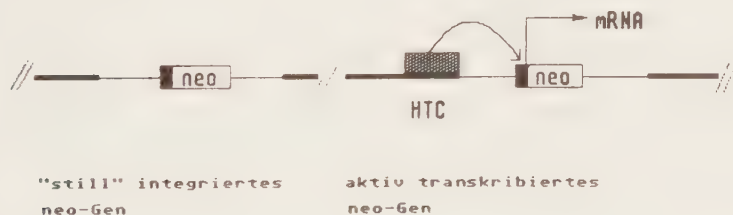


Abb. 40: Modell der Integration von neo-Resistenzplasmiden in die genomische DNA und Aktivierung des defekten Promotors durch ein zelluläres Kontrollelement (HTC)

2. Transfektionsrunde

Um eine Einzelkopie-Integration des neo-Gens zu erreichen, wurden in einer weiteren Transfektionsrunde BHK-Zellen mit Fragmenten zellulärer DNA von resistenten Klonen der 1. Runde transfiziert. Es zeigte sich, daß die Klone stets unter selektiven Bedingungen gehalten werden mußten, da bei einzelnen Klonen sonst ein Verlust der Resistenz auftrat, wahrscheinlich bedingt durch den Verlust der Plasmid-DNA.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß es bei der Transfektion von BHK-DNA-Fragmenten zu homologen Rekombinationsvorgängen gekommen ist (Thomas et al., 1986). Die transfizierten Fragmente hatten eine Länge von bis zu 10 kb, was zu Homologiebildungen zwischen eingeführten BHK-Fragmenten und genomischer DNA der Empfängerzellen führen könnte. Diese Möglichkeit war jedoch für die Isolierung von Transkriptionsaktivatoren nicht weiter von Belang, da der angrenzende zelluläre Bereich kloniert und auf seine Funktion hin untersucht werden sollte. Transkriptionseinheiten, die eventuell unter dem Einfluß solcher Aktivatoren standen, sollten anschließend aus einer Genbank isoliert werden, so daß mögliche Reorganisationen in der DNA aus Zellen der 2. Transfektionsrunde keine Wirkung hatten.

Der zweite Transfektionsschritt brachte folgende Vorteile:

Erstens wurde auf eine Einzelkopie-Integration des neo-Gens, dessen benachbarte DNA im Anschluß kloniert werden sollte, selektioniert. Dies verhinderte eine ungewollte Klonierung von zellulären Sequenzen, die einem nicht aktiv transkribierten neo-Gen benachbart waren und somit keine Kontrollfunktion ausübten.

Zweitens, es wurden nur Klone weiterverwendet, die sich durch ein ausgeprägtes Wachstum in G418 und eine große Menge an neospezifischer RNA auszeichneten. Von diesen war anzunehmen, daß sie unter dem Einfluß besonders starker zellulärer Transkriptionsaktivatoren standen. Somit konnte bereits vor der Klonierung eine Auswahl getroffen werden.

Dieser Schritt, sowie die anschließende Amplifikation durch Fusion mit COS-1-Zellen, erbrachte wesentliche Vorteile gegenüber Selektionsmethoden von zellulären Aktivatoren wie sie z.B. von Drescher et al. (1987), durchgeführt wurden. Bei diesem Versuchskonzept wurden Fragmente eines partiellen Verdaus genomischer DNA eines Maus-Teratokarzinoms vor einen enhancerlosen SV40-Promotor, bzw. ohne Promotor vor das CAT-Gen kloniert, und CAT-Expressionstests durchgeführt. Durch dieses Zufallsverfahren wurde von 120 getesteten Klonen nur einer mit schwach transkriptionsaktivierenden Eigenschaften gefunden (ca. 1/10 der Aktivität von pSV2). Weiterhin erfordert diese Methode einen

großen Arbeitsaufwand, da willkürliche Sequenzen ohne vorherige Selektion in einen Expressionstest eingesetzt werden und die Zahl der Klone damit erwartungsgemäß gering ist. Außerdem ist die Isolierung repetitiver Sequenzen stark begünstigt, während die Chance, ein in Einzelkopie vorliegendes Aktivatorelement mit dieser Methode zu isolieren sehr gering ist.

Amplifikation durch Fusion

Das Fusionsexperiment mit COS-1-Zellen brachte folgende Vorteile:

Das konstitutiv synthetisierte T-Antigen aus den COS-1-Zellen lagerte sich an die T-Antigen-Bindungsstellen des intakten ori-Bereiches des integrierten neo-Plasmids an (es wurden nur Zellklone aus der 2. Transfektionsrunde mit nachgewiesener Einzelkopie-Integration verwendet) und der Replikationsvorgang wurde angeschaltet. Auch der für die Replikation von SV40 benötigte permissive Faktor wurde von den COS-1-Zellen bereitgestellt.

Durch das Fortschreiten der Replikationsgabel in beiden Richtungen wurde auch die an das Plasmid angrenzende zelluläre DNA bis zu einem gewissen Entfernungsbereich amplifiziert. Ein Restriktionsverdau der amplifizierten DNA sollte dann dominante Banden von angereicherten DNA Fragmenten einer definierten Größe liefern, wie z.B. durch den Verdau der amplifizierten DNA eines Klons mit Hind III gezeigt wurde.

Dies war jedoch nicht der Fall bei dem zunächst durchgeführten Restriktionsverdau mit Bam HI. Hierbei waren amplifizierte DNA-Fragmente eines weiten Größenbereiches zu erkennen, die einen über die gesamte Länge des Gels verteilten "Schmier" bildeten. Es ergab sich das gleiche Bild bei der ungeschnittenen niedermolekularen DNA (hierbei waren keine distinkten Banden zu erwarten), wie bei der Bam HI-geschnittenen genomischen DNA. Auf dem Agarosegel war zu erkennen, daß ein Vorliegen ungeschnittener DNA ausgeschlossen werden konnte.

Das Auftreten kleiner Banden ließ sich damit erklären, daß der Replikationsapparat nicht bis zum Erreichen einer Bam HI-Schnittstelle, die wahrscheinlich in relativ großer Entfernung lag, voranschreiten konnte, sondern vorher "abfiel". Eine spekulative Erklärungsmöglichkeit für die großen Banden ist, daß die Bam HI-Schnittstellen im Genom - wie erwähnt - in großer Entfernung von der Integrationsstelle des Plasmids lagen, und sich die Replikationsmaschinerie vor Erreichen dieser Schnittstellen in einer Art Endlosschleife verfangen hatte.

Zumindest im Falle von HTC₁ konnte bei der Analyse des Phagenklons $\lambda 1$ gezeigt werden, daß keine Bam HI-Schnittstelle auf dem 15,7 kb Insertfragment genomischer DNA vorhanden war. Somit lag HTC₁ auf einem Bam H-Fragment von über 16 kb, welches wahrscheinlich einen für die Amplifikation zu breiten Bereich darstellte. So kann man sich entsprechend dem "rolling circle"-Modell vorstellen, daß dabei sowohl Plasmidanteile wie auch zelluläre Bereiche wieder und wieder repliziert wurden, ohne daß die Replikationsgabel dabei weiter "vorwärts" kam und zu einer Bam HI-Schnittstelle gelangte.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, daß die Replikation kurzer Fragmente natürlich zeitlich wesentlich schneller und häufiger abläuft als die Synthese sehr langer Fragmente, die somit stark unterrepräsentiert sind. Beide Modelle würden auch erklären, warum es nicht möglich war, Bam-HI Fragmente, die den SV40-Origin enthielten, in pUC zu klonieren.

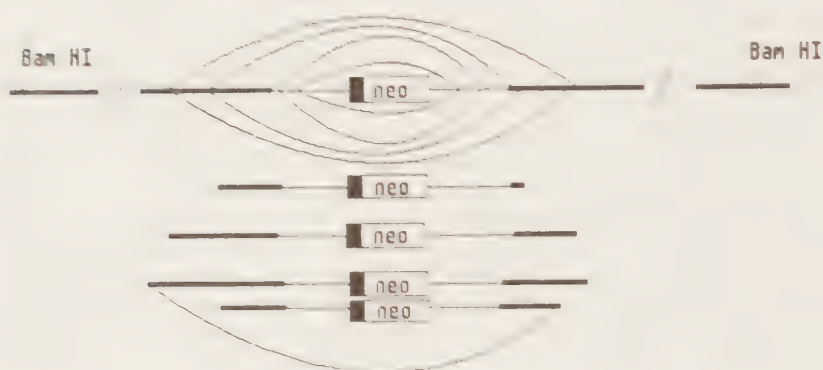


Abb. 41 Modell der Amplifikation und Erklärungsmöglichkeit der Entstehung großer Bam HI-Fragmente

Klonierung der zellulären Kontrollelemente

Voraussetzung für die Klonierung war also zunächst die Auswahl geeigneter, amplifizierter Fragmente definierter Länge ergebender Restriktionsenzyme.

Zur Restriktionsanalyse und anschließender Klonierung wurde amplifizierte niedermolekulare DNA aus Fusionen mit Zellklonen, die ursprünglich mit pdSV8-neo transfiziert worden waren, verwendet. Diese DNA-Fragmente enthielten ausschließlich amplifizierte Bereiche, d.h. DNA-Sequenzen, mit dem integrierten neo-Plasmid und angrenzenden zellulären Bereichen, ohne sonstige genomische DNA, wodurch die Klonierung wesentlich vereinfacht werden sollte.

Die hohe Anzahl korrekter Klone nach Ligation der Hind III/Bgl II-Fragmente mit pUC 12 zeigte, daß der Amplifikationsschritt durch die Anreicherung der zellulären Integrationsstellen mit Hilfe der Fusion in der Tat eine wesentliche Erleichterung gebracht hatte.

Dieser Punkt brachte einen großen Fortschritt gegenüber der von Hamada (1986a,b) angewandten Methode, bei der auf ähnliche Weise mit Hilfe der Expressionsselektion in HeLa-Zellen nach Transkriptionsaktivatoren gesucht wurde. Auch hier wurden zelluläre Integrationsbereiche kloniert, allerdings in λ -Phagen, was ein langwieriges "Screenen" von Phagenplaques erforderte.

Der Restriktionsverdau der amplifizierten niedermolekularen DNA des späteren HTC₂-Klons mit Hind III bzw. Hind III / Bgl II ergab folgendes Bild: Der defekte Promotor sowie das HTC₂-Element lagen auf einem 1,2 kb Hind III/Bgl II-Fragment, während sich durch das Fortschreiten der Replikationsgabel in die andere Richtung bei der Restriktion ein Hind III-Fragment von 3,5 kb Länge ergab. Durch späteres Sequenzieren konnte der Plasmidanteil des Hind III/Bgl II-Fragments auf 650 bp eingeschränkt werden. Dies bedeutete, daß die Gesamtlänge des integrierten neo-Plasmids kleiner als 4,1 kb (3,5 kb + 650 bp) gewesen sein mußte, und somit ca. 1,6 kb des Plasmidanteils im 3'-Bereich des neo-Gens deletiert wurden (siehe auch 4.6.1.).

Es ist unklar, ob dieses Deletionsereignis bei der Integration oder beim Amplifikationsprozeß stattgefunden hat, und ob die Rekombination des Plasmidanteils an der Integrationsstelle von HTC₂ damit in irgendeinem Zusammenhang steht. Bei dem zweiten pUC-Klon mit dem 0,6 kb Hind III/Bgl II-Fragment wurde keine Hybridisierung mit pdSV8neo-Gesamtplasmid vorgenommen, so daß ein eventuelles Deletionsereignis am 3'-Ende des neo-Gens nicht erfaßt werden konnte.

Aktivität von HTC₁ und HTC₂ in transienten Expressionstests

Die Überprüfung von HTC₁ und HTC₂ im transienten Expressionstest ergab hohe CAT-Aktivitäten, was die Effizienz der Selektionsverfahren (1. und 2. Transfektionsrunde) bewies.

Die Aktivitätstests der 3'-Klone von HTC₁ und HTC₂ ergaben, daß beide Elemente in einer bevorzugten Orientierung stimulierend auf den Promotor wirkten.

Bei den 3'-Klonen von HTC₂ bewirkte eine Verdoppelung des zellulären Elements einen Anstieg der Transkriptionsaktivität, während bei einer Vervierfachung die Aktivität drastisch absank. Dies könnte durch eine Modellvorstellung von kooperativ bindenden, in limitierter Anzahl vorhandenen Faktoren erklärt werden. So könnte man vermuten, daß an ein HTC₂-Element ein Faktorenpaar bindet und der Promotor dadurch stimuliert wird. Sind zwei HTC₂-Elemente und eine genügende Anzahl von Faktoren vorhanden, so können zwei Faktorenpaare gebunden werden und die Transkription erhöht sich noch. Sind jedoch vier HTC₂-Elemente hintereinandergeschaltet, so werden die Faktoren ausgedünnt. Es binden dann nur noch einzelne Faktoren an einzelne HTC₂-Elemente.

aber nicht mehr unbedingt paarweise, so daß die Aktivität des Promotors wieder absinkt (siehe auch Modellvorstellung von Enhansons, Ondek et al. 1988).

Insgesamt ließ sich feststellen, daß die einen Enhancer auszeichneten Eigenschaften, nämlich einen Promotor unabhängig von Distanz und Orientierung zu aktivieren, in BHK-Zellen sowohl bei HTC_1 als auch bei HTC_2 zu finden waren.

Die Transfektion von HTC_1 und HTC_2 in verschiedene Zelllinien erbrachte einen Hauptunterschied zwischen den beiden Aktivatorelementen.

HTC_1 zeigte in HeLa-Zellen und in TC7-Zellen transkriptionsaktivierende Wirkung, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß als in BHK-Zellen. Der β -Klon zeigte dagegen keinerlei Aktivierung des Promotors. Somit war der Enhancereffekt von HTC_1 in diesen Zellen nicht mehr nachzuweisen.

Bei HTC_2 dagegen zeigten weder der 5'-Klon noch der 3'-Klon in TC7-Zellen und in HeLa-Zellen eine Transkriptionsaktivierung. Daraus hatte man schließen können, daß HTC_2 eine strikte Zellspezifität aufweist, die auf BHK-Zellen beschränkt ist.

Dies wurde jedoch durch Transfektionsexperimente mit L-Zellen der Maus (Fibroblasten) widerlegt. Hierbei ergab sich eine umgekehrte Situation wie bei den epithelialen Zellen.

HTC_1 wirkte in den Fibroblastenzellen weder in der 5'- noch in der 3'-Orientierung eine erhöhte Transkriptionsrate des CAT-Gens, während bei HTC_2 eben dies der Fall war. Sowohl der 5'-Klon wie auch der 3'-Klon von HTC_2 konnten den pdSV8-Promotor in L-Zellen stimulieren, wenn auch nur in relativ geringem Ausmaß und wiederum orientierungsabhängig (in 3'-Richtung geringer als in 5'-Richtung). Man kann aus diesen Resultaten folgende Spekulationen ableiten.

Erstens: HTC_1 ist nur in epithelialen Zellen aktiv, und dies - abgesehen von BHK-Zellen, aus denen es isoliert wurde - nur als transkriptionsaktivierendes Element, aber ohne Enhancerfunktionen.

Zweitens: HTC_2 gehört zu einer Klasse von aktivierenden Sequenzen, von denen einzelne Subgruppen, wahrscheinlich mit Hilfe unterschiedlicher Faktoren, in verschiedenen Zellen aktiv sein können und auch fallweise Enhancereigenschaften haben können. So könnten derartige benötigte Faktoren in BHK-Zellen und in L-Zellen vorhanden sein, nicht aber in TC7- und in HeLa-Zellen.

Auf diese Weise könnte es möglich sein, daß gleiche oder ähnliche Aktivatorelemente in unterschiedlicher Umgebung eine der jeweiligen Situation angepasste Funktion ausüben können.

Sequenzen von HTC₁ und HTC₂

Die Sequenzanalysen von HTC₁ und HTC₂ ergaben eine Länge an zellulärer DNA von 324 bp bzw. 469 bp. Der Plasmid-DNA-Anteil der ursprünglichen pUC-Klone betrug bei HTC₁ bis zur Sph I Schnittstelle 59 bp, das heißt die Öffnung des Plasmids bei der Integration war in kurzer Distanz zu dem defekten Promotor erfolgt.

Bei dem pUC-Klon von HTC₂ betrug der Plasmid-Anteil zwischen der zellulären DNA und dem defekten Promotor ca. 650 bp und wies eine invertierte pBR 322 Sequenz von 12 bp und eine gleich anschließende Deletion von 18 bp auf. Die Herkunft dieser Reorganisation im Plasmidanteil sowie der Grund für das Auftreten einer 18 bp Homologie zu einer pBR 322 Sequenz in der zellulären DNA von HTC₁ blieben unbekannt, könnten jedoch durch Rekombinationsereignisse in die zelluläre DNA gelangt sein.

Bei HTC₁ ergaben sich folgende Besonderheiten:

Es wurden zwei homologe Sequenzen mit jeweils 1 bp Abweichung zur SV40-Enhancer-core Sequenz gefunden, ebenso eine homologe Region (2 bp Unterschiede) zur Konsensussequenz des E1A-Enhancer-core.

Des weiteren ergab sich eine potentielle Bindungsstelle für das transkriptionsaktivierende Protein AP 4 und eine invertierte CCAAT-Box, die ebenfalls als Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren dienen konnte. Es bliebe zu klären, ob diese Sequenzen als Proteinbindungsstellen dienen.

DNA-Bereiche, die in Z-DNA-Konformation vorliegen können, sind ebenfalls als mögliche Anlagerungspunkte für DNA-bindende Proteine postuliert worden, die ihrerseits die Transkription stimulieren können (Nordheim & Rich, 1983). Die Autoren konnten zeigen, daß Bereiche von nur 8 bp Länge alternierender Purine und Pyrimidine eine negative, superhelikale Struktur aufzeigen und in vielen Enhancern paarweise mit einem Abstand von 20 - 80 bp auftreten. Die hier gezeigten Bereiche alternierender Purin/Pyrimidin-Basenfolgen sollen auf diese Tatsache hinweisen, jedoch ist auch hier noch kein Beweis für eine Proteinbindung gegeben.

Ebenso wurde gefunden, daß inverse Repetitionen eine Palindromstruktur aufweisen und Angriffspunkte für Transkriptionsfaktoren darstellen können. Auch bei HTC₁ wurden inverse Repetitionen gefunden, die somit als Anlagerungspunkt für solche Faktoren dienen könnten. Allerdings wies nur eine Repetition eine perfekte Palindromstruktur von 7 bp Länge auf.

Weiterhin auffällig war der hohe Anteil von CG Dinukleotiden (27 CG Paare in 324 bpl). Es ist bekannt, daß in der 5' Region von "housekeeping" Genen, d.h. Genen, die für Produkte des allgemeinen Zellhaushalts kodieren, oft Häufungen von nicht-methylierten CG Dinukleotiden in sogenannten HTF-Inseln (von *Hypalliny fraction*, bezogen auf die Entstehung aus dem Verdau mit methylierungs-sensitiven Enzymen, Cooper et al., 1983) auftreten. Diesen Genen fehlen häufig TATA-Boxen. Die Annahme, daß es sich bei dem von HTC_1 kontrollierten Gen um ein solches, konstitutiv exprimiertes Transkript handelt, steht jedoch eigentlich im Widerspruch mit der hohen transkriptionsaktivierenden Wirkung von HTC_1 . So sind starke Enhancerelemente - soweit bekannt - meist mit kurzfristig zu aktivierenden Genen bzw. Genen eines spezialisierten Zelltyps assoziiert, weniger mit Genen für allgemeine Funktionen. Jedoch wurden in letzter Zeit auch CG-reiche 5'-Regionen in Genen gefunden, die nicht zur Klasse der "housekeeping"-Gene gehören, wie z.B. im Gen für den EGF-Rezeptor (Ishi et al., 1985a) und in dem Gen für das menschliche Harvey ras Protoonkogen (Ishi et al., 1985b). Die Autoren spekulierten hierbei mit der Möglichkeit gemeinsamer Regulationsmechanismen bei derartigen Wachstumskontrollgenen.

Aus der Auswahl von Sequenzhomologien, die über Computeranalyse gefunden wurden, seien hier 4 Homologien zu 5'-nichtkodierenden Bereichen von Genen, in denen ebenfalls Regulationselemente vermutet werden, erwähnt (humanes Präproenkephalin A-Gen, bovines Thyroglobulin-Gen, Gen des muscarinen Acetylcholinrezeptor aus dem Schwein, Gen für die schwere Kette des Myosins aus dem Skelettmuskel der Maus; siehe Anhang).

Eine weitere Homologie wurde zu einem 3'-Bereich des α -Globin Gens aus dem Pferd gefunden.

Alle sonstigen Homologien waren in Exonsequenzen von Genen lokalisiert, von denen hier nur das humane β -Tubulin-Gen aus Gründen einer 100%igen Homologie angegeben wurde.

Auch in der Sequenz von HTC_2 waren zwei homologe Bereiche zur SV40-Enhancer-core-Sequenz zu finden, wobei einer eine perfekte Homologie aufwies, der andere 1 bp Abweichung von der Konsensussequenz zeigte. HTC_2 enthielt ebenfalls eine Homologie zur Konsensussequenz des E1A Enhancers (1 bp Abweichung).

Weitere Sequenzmotive von potentieller funktioneller Bedeutung waren eine CCAAT-Box sowie eine invertierte CCAAT-Box, ebenso ausgeprägte Homologien zu Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren wie AP 1, AP 2 und AP 5. Hierbei ist anzumerken, daß die AP 1-Bindungsstelle nicht in der zellulären DNA, sondern direkt im Anschluß in den invertierten 18 bp der pBR 322 Sequenz lag. Es bliebe zu klären, ob diese Rekombination auf funktionellen Selektionsdruck hin erfolgt war, d.h. ob ein Aktivitätsabfall von HTC_2 nach Deletion dieser AP 1-Stelle zu beobachten ist.

Ebenso wurden auch bei HTC₂ mögliche Palindromstrukturen und Z-DNA-Bereiche aufgezeigt. Auch hier mußten alle gefundenen Sequenzhomologien auf funktionelle Homologien hin untersucht werden, z.B. durch Proteinbindungstudien.

Bei der computergestützten Suche nach Sequenzhomologien zu anderen Genen ergab sich - wahrscheinlich bedingt durch das repetitive Auftreten von HTC₂ - eine große Anzahl von Homologien, von denen hier nur einige erwähnt werden sollen.

Auffällig war, daß in ca. 70% aller Homologien ein Fragment von 13 bp der Sequenz 5'-GAGATGGCTCAGT-3' auftauchte. So lag diese Sequenz z.B. im 5'-Bereich der LTR-Region eines endogenen Maus-Retrovirus, wobei weiter 8 bp stromaufwärts von der 13 bp-Box Teil eines "Alu-Repeats" der Maus-DNA waren.

Weiterhin war die 13 bp-Box im Cytochrome P-3-450 der Maus am 3'-nicht-translatierten Ende, ebenso in der direkt 3'-anschließenden Region der an das embryonale β -Globin der Maus angrenzenden Sequenz, in der D-J-C-Region der schweren Kette des murinen Immunglobulins, sowie in vielen anderen Sequenzen enthalten.

Die Bedeutung dieser Box für die transkriptionsaktivierende Rolle von HTC₂ mußte durch Deletions- bzw. Mutationsexperimente ermittelt werden, ebenso deren Funktion in den erwähnten Genen.

Homologien, die außerhalb der 13 bp-Box lagen, waren unter anderem in einem repetitiven Maus-DNA-Fragment (L1) zu finden, in der 3'-Sequenz eines humanen B-Zell-Leukämie-Protoonkogens (bc1-2), sowie in der DNA eines humanen endogenen Retrovirus.

In all diesen genannten homologen Sequenzen wurde bisher nicht nach distinkten regulatorischen Elementen gesucht und es können somit keine Rückschlüsse auf eventuelle funktionelle Homologien in HTC₁ und HTC₂ gezogen werden.

Ein noch zu klärender Punkt wäre auch, ob die beiden isolierten zellulären Enhancer-Elemente HTC₁ und HTC₂ völlig unabhängig von den in pSV8 vorhandenen restlichen SV40-Enhancersequenzen aktiv sein können. So sind 18 bp des defekten Promotors von Pos. 161-178 ein Teil der von Herr & Clarke (1986) postulierten Domäne C (Einteilung des SV40-Enhancers in die funktionellen Bereiche A, B und C) mit der Enhancer-core-Sequenz. Die Autoren konnten zeigen, daß der Verlust einzelner Domänen durch die Multimerisierung eines verbleibenden funktionellen Elements kompensiert werden kann. Diese Situation könnte sich durch die in HTC₁ und HTC₂ gefundenen Homologien zur Enhancer-core-Sequenz widerspiegeln. So ist nicht auszuschließen, daß durch diese Duplizierung des Enhancerelements die promotoraktivierende Wirkung entstanden oder verstärkt worden ist.

Trotzdem ist eine Wechselwirkung als relativ unwahrscheinlich anzusehen, da die artifiziellen Duplikationen in den Experimenten von Herr und Clarke Tandemduplikationen der einzelnen funktionellen Elemente darstellten, ohne zwischengelagerte Basenpaare. Bei einer angenommenen synergistischen Wirkung der Basen aus dem SV40-Enhancer von p δ SV8 und den Enhancer-Homologien aus HTC₁ bzw. HTC₂ lagen im ersten Fall ca. 150 bp, im zweiten Fall ca. 70 bp zwischen den beiden Elementen (im Falle der λ -Klone waren die Abstände noch wesentlich größer). Dies wurde auch dem von Oudek et al. (1988) entwickelten Modell der Einteilung von Enhancern in Enhancerelemente und diese wiederum in "Enhansons", widersprechen. Nach dieser Theorie sind "Enhansons" kurze Basefolgen (gleicher oder unterschiedlicher Art), die mit einem Abstand von nicht mehr als 5 bp als Dimere vorliegen und nur in dieser Form Transkriptionsfaktoren binden. Solche Dimere werden wiederum als Enhancerelemente bezeichnet, von denen mehrere zusammen mit einem Abstand von nicht mehr als 100 bp den eigentlichen Enhancer-Effekt ausmachen.

Dennoch mußte diese Annahme in CAT-Aktivitätstests oder ähnlichen Untersuchungen mit HTC₁ und HTC₂ in einem SV40-System ohne jegliche Enhancersequenzen bestätigt werden.

BHK-Genbank

Aus der genomischen Bank von BHK-DNA in dem λ -Phagen EMBL 3A⁺ wurde ein Klon isoliert, der nur ca. 50% (zwischen der Pst I- und der Pvu II-Schnittstelle bis zur ursprünglichen Bgl II-Schnittstelle der amplifizierten DNA) des 324 bp Fragments von HTC₁ enthielt. Trotz wiederholter Versuche gelang es nicht, einen Klon mit den anschließenden HTC₁-Sequenzen zu isolieren, was auf eine Unterrepräsentation dieses Genabschnitts in der Genbank hindeutet. Weder auf dem 3,0 kb Hind III Sal I-Fragment, auf dem der HTC₁-Anteil lokalisiert war, noch in dem benachbarten 5,6 kb Hind III-Fragment konnte eine mRNA lokalisiert werden.

Dies deutete - ebenso wie die Ergebnisse aus den CAT-Aktivitätstests mit den λ -Klonen, die auf eine bevorzugte Richtung der Promotoraktivierung schließen ließen - daraufhin, daß das von HTC₁ kontrollierte Gen nicht auf dem untersuchten λ -Klon lag.

Weiterführende Experimente sollten die Subklonierung von HTC₁ und HTC₂ sowie anschließende transiente Expressionstests der einzelnen Fragmente beinhalten, um die transkriptionsaktivierenden Bereiche einzugrenzen. Daraus erhaltene Subklone könnten dann für Proteinbindungsstudien in Gel-Retentionstests eingesetzt werden, sowie wiederum auf Zellspezifität, Enhanceraktivität usw. untersucht werden. Im Falle der Isolierung des von HTC₁ beeinflussten Gens

bestände die Möglichkeit, durch Northern Blot-Analysen eventuelle Expressionsunterschiede bezüglich verschiedener Zell- oder Gewebsarten, in primären Zellen und in transformierten Zellen sowie in Zellen verschiedener Organismen aufzuzeigen.

Ebenso könnte man weitere Zelllinien (allogene und xenogene) auf das Vorkommen von HTC₁-homologen Sequenzen hin untersuchen und deren transkriptionsaktivierende Wirkung testen. Wichtig wäre weiterhin, die Wirkung von HTC₁ und HTC₂ auf heterologe Promotoren zu testen.

Analog dem Vorgehen von Drescher et al., 1987, bestände auch die Möglichkeit, Familien mit Sequenzhomologien zu HTC₂ zu isolieren und deren transkriptionsaktivierenden Eigenschaften zu untersuchen. Die Autoren konnten zeigen, daß homologe Sequenzen zu einem Element aus Maus-Zellen, das schwach transkriptionsaktivierende Eigenschaften hatte und wie HTC₂ repetitiv in der Zelle vorlag, ebenfalls promotorstimulierend wirkten.

Die Experimente von V. von Hoyningen-Huene et al., 1986, mit einem Transkriptionskontrollelement aus Maus-DNA haben ergeben, daß dieses Element auch die Eigenschaften eines Promotors aufwies (ohne eine TATA-Box-Homologie zu besitzen). Um diese Möglichkeit in HTC₁ und HTC₂ zu testen, könnten S1-Analysen zur exakten Bestimmung des Transkriptionsstarts durchgeführt werden.

Ebenso wäre es für weitergehende Arbeiten interessant, auch die mutmaßlichen zellulären Promotorstrukturen aus mit pSV0 transfizierten resistenten Zellklonen zu isolieren und zu untersuchen.

Abschließend lassen sich die Vorteile der hier dargestellten Selektionsmethode gegenüber anderen Methoden wie folgt abgrenzen und zusammenfassen:

Die "Enhancerfalle" von Weber et al., 1984, beruht auf der intrazellulären Rekombination zwischen transfizierten DNA-Fragmenten mit eventuellen Enhancereigenschaften und einem enhancerlosen SV40-Vektor mit dem Ziel, infektiöse Viruspartikel zu erzeugen. Wahrscheinlich auf Grund einer starken Größenbeschränkung (das Hybridmolekül muß verpackt werden können) und des Selektionsdrucks auf extrem starke Enhancer konnten mit dieser Methode keine zellulären Transkriptionskontrollelemente gefunden werden.

Die Methode von Fried et al., 1983, erfordert die Klonierung zellulärer Sequenzen in einen enhancerlosen Vektor, dessen Transfektion in geeignete Zellen und dem anschließenden Test auf transformierte Zellen. Diese Methode führte zwar zur Isolierung eines Maus-Elements mit Enhancereigenschaften, läßt sich jedoch wegen des hohen experimentellen Aufwands schlecht in größerem Maßstab zur Isolierung von Transkriptionskontrollsequenzen einsetzen.

Das gleiche gilt für die Methode von Hamada, 1986, bei der zwar der Klonierungsschritt durch die Expressionss Selektion vermieden wurde, die jedoch durch aufwendiges, aber unerläßliches "Sreenen" von Phagenplaques nötig erfordert.

Mit dieser Arbeit wurde als Verbesserung und Weiterführung bisheriger Methoden eine experimentelle Vorgehensweise aufgezeigt, um zelluläre Transkriptionskontrollelemente schnell und in großer Anzahl zu isolieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Genom einer embryonalen Hamsternierenzelllinie (BHK) wurden zwei Transkriptionskontrollelemente isoliert und charakterisiert. Die Isolierung erfolgte über den Weg der doppelten Expressionsselektion. Hierzu wurden BHK-Zellen mit einem Plasmid, dessen Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines enhancerdefekten SV40-Promotors stand, transfiziert und in Selektionsmedium (mit G418) überführt. G418-resistente Zellklone wurden vereinzelt und - da bei allen Klonen multiple Insertionen des Resistenzplasmids auftraten - einer 2. Transfektionsrunde unterzogen.

Hierbei wurden BHK-Zellen mit DNA-Fragmenten G418-resistenter Zellklone transfiziert. Es wurde sowohl auf die Einzelkopie-Integration des Resistenzplasmids wie auch auf die Stärke der Expression des neo-Gens selektioniert. Da der defekte Promotor ursprünglich nicht in der Lage war, eine genügende Transkription des neo-Gens zu bewirken, konnte diese in den resistenten Zellklonen nur durch den Einfluß eines benachbarten zellulären Aktivatorelements und der damit verbundenen Kompensation des Promotordefekts erfolgt sein.

Zur Erleichterung der Klonierung dieser in Einzelkopie vorliegenden zellulären Transkriptionsaktivatoren wurde ein Amplifikationsschritt zwischengeschaltet. Hierzu wurden einzelne resistente Zellklone der 2. Transfektionsrunde mit COS-1-Zellen fusioniert. Die Fusion führte - mit Hilfe des von den COS-1-Zellen eingebrachten T-Antigens und des permissiven Faktors - zu wiederholten Replikationsvorgängen am intakten SV40 Origin des integrierten Plasmids. Diese Replikationsereignisse ergaben eine Amplifikation der Plasmid- wie auch der angrenzenden zellulären DNA.

Aus zwei Fusionen wurden die amplifizierten zellulären DNA-Sequenzen am 5'-Ende der integrierten Plasmide kloniert. In transienten Expressionstests (CAT-Aktivitätstests) konnten die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften dieser Sequenzen bestätigt werden, wobei die beiden Elemente HTC₁ und HTC₂ ("hamster transcription control") ca. 95% bzw. 80% der Aktivität des SV40-Promotors erreichten und somit zu einer Klasse von starken Transkriptionsaktivatoren gezählt werden können. Klonierungen an das 3'-Ende des CAT-Gens in unterschiedlichen Orientierungen und anschließende Expressionstests ergaben, daß sowohl HTC₁ als auch HTC₂ Eigenschaften eines Enhancers aufwiesen.

Die Transfektion von HTC₁ und HTC₂ in verschiedene Zelllinien zeigte, daß HTC₁ nur in Epithelialzellen (BHK-, HeLa-, TC7 -Zellen) aktiv war, während HTC₂ auch in L-Zellen (Fibroblasten) promotorstimulierende Wirkung zeigte.

Das Ergebnis einer genomischen Analyse war, daß HTC₁ als Einzelkopiesequenz in der DNA vorlag, während HTC₂ zu den "interspersed repetitive elements" zählte. Weiterhin ergaben Sequenzvergleichsanalysen, daß in beiden Elementen Homologien zu bekannten Enhancermotiven vorhanden waren.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß die Methode der doppelten Expressionsselektion mit anschließender Amplifikation einen schnellen und einfachen Weg zur Isolierung zellulärer Transkriptionsaktivatoren darstellt.

7. ANHANG

Computergestützte Sequenzhomologien (Auswahl) von HTC_1 :

Die obere Sequenz bedeutet dabei den Bereich aus HTC_1 , die untere den entsprechenden Homologiebereich des jeweiligen Gens.

- a) Humanes β -Tubulin-Gen mit 10 Sequenzbereichen aus der Familie der Alu-Repetitionen

131	GCCGCCGTGTTCCGG	145
7594	GCCGCCGTGTTCCGG	7608

Länge: 15 bp Homologie: 100 %
(Gwo-Shu Lee et al., 1984)

- b) Humanes Preproenkephalin A Gen, flankierende 5'-Region

66	GCAAGTTCTCCGGCCGCTTGGGT	78
534	GCAAGTTCAAGCGCCCGCTGGGT	556
	* ***	

Länge: 23 bp Homologie: 82,6 %
(Tereao et al., 1983)

- c) Bovine Thyroglobulin mRNA, 5'-Ende

205	TGAAGTGCAGGACGAGGCGCGGCTATCG	235
1419	TCAAGTGCAGGCGAGGCGGCGCAAGCTCTCG	1389
	* * * * *	

Länge: 31 bp Homologie: 80,6 %
(Mercken et al., 1985)

- d) α -1 Globin Gen aus dem Pferd (BII Haplotyp)

196	TGCCCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGC	222
1304	TGCAAGGAATGAAGTGCAGGAAGAGGC	1278
	*** * *	

Länge: 27 bp Homologie: 81,5 %
(Clegg et al., 1984)

e) mRNA für den muskarinen Acetylcholin-Rezeptor (mAChR) aus dem Schwein

```

141  TCCGGCTGTCAGCGCAAGG  159
142  TCCGGCTGCCAGCGCAAGG  168
      *      *

```

Länge: 19 bp Homologie: 89,5 %
(Kubo et al., 1986)

f) Carboxylende der mRNA für die schwere Kette des Myosins des Skelettmuskels aus der adulten Maus

```

5   CAAGAGACAGGATGAGGA
177 CAAGAGACAGGCTGAGGA
      *

```

Länge: 18 bp Homologie 94,4 %
(Weydert et al., 1983)

Computergestützte Sequenzhomologien (Auswahl) von HTC₂:

Die obere Sequenz bedeutet dabei den Bereich aus HTC₂, die untere den entsprechenden Homologiebereich des jeweiligen Gens.

a) Endogenes Retrovirus (MuLV-ähnlich) der Maus (Balb/c), 5' LTR-gag

```

132  TTGATGGCTAGGGAGATGGCTCAGT  156
71   TTAGGGGCTGGCAAGATGGCTCAGT  95
      *      *   **

```

Länge 25 bp Homologie: 84 %
(Chin-Yih Ou et al., 1983)

e) Maus DNA Fragment 110

```

137  GGCTAGGGAGATGGCTCAGTCAGCAAGTATCTTCTGTGAAGCGTGGGTACCTGAGTT
245  GGCTGGGGAGAGGGCTCAGTGAGTAAACACTTGCTGGGCAAGCATGCGGGAC TGAGTT
      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

```

197  TGA TCCCAAAAACC 218
186  CAAATCCCCAGGACC 172
      ** *      * **

```

Länge: 75 bp Homologie: 69,3 %
(Höchtel & Zachau, 1983)

f) Lange unterbrochene L1-Repetition der Maus, 5'-Region

```

318  TTAATTTCTTTCTTTA 333
2109 TTAATTTCTTTCTTTA 2094

```

Länge: 16 bp Homologie: 100 %
(Mottez et al., 1986)

g) Humane B-Zell Leukämie Lymphom 2 (bcl-2) Protoonkogen mRNA

```

32  AATTGTGCAGAGAAAAG 48
2904 AATTGTGCCGAGAAAAG 2920
      *

```

Länge: 17 bp Homologie: 94,1 %
(Tsujimoto & Croce, 1986)

h) DNA eines humanen endogenen Retrovirus (4-1), vollständiges retrovirales Segment

```

416  TCAGTTTCCTCTTTCAACAGA 4437
1862 TCATGTTTCCTCTTTAAACAGA 1883
      **      *

```

Länge: 22 bp Homologie: 89,5 %
(Steele et al., 1984)

8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Banerji,J., Olson,L., W.Schaffner, 1983:
A lymphocyte specific cellular enhancer is located
downstream of the joining region in immunoglobulin heavy
chain genes
Cell 33.729-740
- 2 Banerji,J., Rusconi,S., W.Schaffner, 1981:
Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote
SV40 DNA sequences
Cell 27.299-308
- 3 Berg,P.E., Popovic,Z., W.F.Anderson, 1984:
Promoter dependence of enhancer activity
Mol. Cell. Biol. 4 (8).1664-1668
- 4 Bird,A.D., 1986:
CpG-rich islands and the function of DNA methylation
Nature 321.435-437
- 5 Birnboim,H.C., J.Doly, 1979:
A rapid alkaline extraction procedure for screening
recombinant plasmid DNA
Nucleic Acids Res. 7.1513-1523
- 6 Bishop,J.M., 1983:
Cellular oncogenes and retroviruses
Annu. Rev. Biochem. 52.301-354
- 7 Blattner,F.R., Williams,B.G., Blechl,A.E.,
Denniston-Thompson,K., Furlong,L-A., Grunwald,D.J.,
Kiefer,D.O., Moore,D.D., Schumm,J.W., Sheldon,E.L.,
O.Smithies, 1977:
Charon phages: safer derivatives of bacteriophage Lambda
for DNA cloning
Science 196.161-169
- 8 Botchan,M.K., Topp,W., J.Sambrook, 1979:
Studies on simian virus 40 excision from cellular
chromosomes
C. S. H. Sym. Quant. Biol. 43.709-719
- 9 Boyer,H.W., D.Roulland-Dussoix, 1969:
A complementation analysis of the restriction and
modification of DNA in Escherichia coli
J. Mol. Biol. 41.459-472
- 10 Bradford,M., 1976:
A rapid and sensitive method for quantitation of
microgramm quantities of protein utilizing the principle
of dye-binding
Anal.Biochem. 72.248-254
- 11 Briggs,M.R., Kadonaga,Y.T., Bell,S.P., R.Tjian, 1986:
Purification and biochemical characterisation of the
promoter-specific transcription factor SPI
Science 234.47-52

- 12 Brown,D.D., 1984:
The role of stable complexes that repress and activate
eukaryotic genes
Cell 37,359-365
- 13 Busslinger,M., Hurst,T., R.A.Flavell, 1983:
DNA methylation and regulation of globin gene expression
Cell 34,197-206
- 14 Cavell,J.K., 1982:
Double minutes and homogeneously stained regions: gene
amplification in mammalian cells
Annu. Rev. Genet. 16,21-59
- 15 Chen,E.Y., Seeburg,P.H., 1985:
Supercoil sequencing: A fast and simple method for
sequencing plasmid DNA
DNA 4,165-170
- 16 Clarke,J., W.Herr, 1987:
Activation of mutated simian virus 40 enhancers by
amplification of wild-type enhancer elements
J. Virol. 61 (11),3536-3542
- 17 Clegg,J.B., Goodbourn,S.E.Y., M.Braend, 1984:
Genetic organisation of the polymorphic equine alpha
globin locus and sequence of the BII alpha 1 gene
Nucleic Acids Res.12,7874-7888
- 18 Colbere-Garapin,F., Horodniceanu,F., Khourilsky,P.,
A.C.Garapin, 1981:
A new dominant hybrid selektive marker for higher
eukaryotic cells
J. Mol. Biol. 150,1-14
- 19 Cooper,D.N., Taggart,M.H., A.P.Bird, 1983:
Unmethylated domains in vertebrate DNA
Nucleic Acids Res. 11 (3),647-653
- 20 Darnell,J.E.Jr., 1982:
Variety in the level of gene control in eucaryotic cells
Nature 297,365-371
- 21 Davies,J., D.J.Smith, 1978:
Plasmid determined resistance to antimicrobial agents
Annu. Rev. Microbiol. 32, 469-518
- 22 Deb,S., De Lucia,A.L., Baur,C.P., Koff,A., P.Tegtmeier,
1986:
Domain structure of the simian virus 40 core origin of
replication
Mol. Cell. Biol. 6,1663-1670
- 23 Doerfler,W., 1983:
DNA methylation in gene expression
Annu. Rev. Biochem. 52,93-124

- 24 Drescher,U., Chowdhury,K., P.Gruss, 1987:
Isolation and characterisation of murine transcriptional control elements using a shotgun method
DNA 6 (4),307-316
- 25 Dunn,T.M., Hahn,S., Ogden,S., R.F.Schleif, 1984:
An operator at -280 base pairs that is required for repression of araBAD operon promoter: addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression
Proc. Natl. Acad. Sci.USA 81,5017-5020
- 26 Dynan,W.S., R.Tjian, 1983:
The promoter specific transcription factor Spl binds to upstream sequences in the SV40 early promoter
Cell 35,381-392
- 27 Dynan,W.S., R.Tjian, 1985:
Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence specific binding proteins
Nature 316,774-778
- 28 Elgin,S.R.C., 1981:
DNase I-hypersensitive sites of chromatin
Cell 27,413-415
- 29 Favaro,J., Freisman,R., R.Kamen, 1980:
Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping
Methods Enzymol. 65,718
- 30 Feinberg,A.P., B.Vogelstein, 1983:
A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity
Anal. Biochem. 132,6-13
- 31 Feinberg,A.P., B.Vogelstein, 1984:
Addendum to Feinberg and Vogelstein,1983
Anal. Biochem. 137,266-267
- 32 Fried,M., Griffith,M., Davies,B., Bjursell,G., La Mantia,G., L.Lania, 1983:
Isolation of cellular DNA sequences that allow expression of adjacent genes
Proc. Natl. Acad. Sci. 80,2117-2121
- 33 Frischauf,A.-M., Lehrach,H., Polstka,A., N.M.Murray, 1983:
Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences
J. Mol. Biol. 170,827-842
- 34 Fromm,M., P.Berg, 1982:
Deletion mapping of DNA required for SV40 early promoter function in vivo
J. Mol. Appl. Genet. 1,457-481

- 35 Gey,G.O., Coffman,W.D., M.T.Kubicek. 1952:
Tissue culture studies of the proliferative capacity of
cervical carcinoma and normal epithelium
Cancer Res. 12,264-265
- 36 Gluzman,Y., 1981:
SV40 transformed simian cells support the replication of
early SV40 mutants
Cell 23,175-182
- 37 Gluzman,Y., T.Shenk. 1983:
Enhancers and eukaryotic gene expression
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 38 Gorman,C.M., Moffat,L.F., B.H.Howard. 1982:
Recombinant genomes which express chloramphenicol
acetyltransferase in mammalian cells
Mol. Cell. Biol. 2 (9),1044-1051
- 39 Graham,F.L., A.J.van der Eb. 1973:
A new technique for the assay of infectivity of human
adenovirus 5 DNA
Virology 52,455-456
- 40 Graves,B.J., Johnson,P.F., S.L.McKnight. 1986:
Homologous recognition of a promoter domain common to
the MSV LTR and the HSV tk gene
Cell 44,565-576
- 41 Gruss,P., Dhar,R., G.Khoury, 1981:
Simian virus 40 tandem repeated sequences as an element
of the early promoter
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (2),943-947
- 42 Hamada,H., 1986a:
Activation of an enhancerless gene by chromosomal
integration
Mol. Cell. Biol. 6 (12),4179-4184
- 43 Hamada,H., 1986b:
Random isolation of gene activator elements from the
human genome
Mol. Cell. Biol. 6 (12),4185-4194
- 44 Hanahan,D., 1983:
Studies on transformation of Escherichia coli with
plasmids
J. Mol. Biol. 166,557-580
- 45 Hansen,J.N., Konkkel,D.A., P.Leder, 1982:
The sequence of a mouse embryonic gamma-globin gene
J. Biol. Chem. 257 (2),1048-1052
- 46 Hearing,P., T.Shenk. 1983:
The adenovirus type 5 E1A transcription control region
contains a duplicated enhancer element
Cell 33,695-703

- 47 Herr.W., J.Clarke. 1986:
The SV40 enhancer is composed of multiple functional elements that can compensate for one another
Cell 45,461-470
- 48 Herr.W., Y.Gluzman. 1985:
Duplications of a mutated simian virus 40 enhancer restore its activity
Nature 313,711-714
- 49 Hirt.B., 1967:
Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture
J. Mol. Biol. 26,365-369
- 50 Hoechstl.J., H.G.Zachau, 1983:
A novel type of aberrant recombination in immunoglobulin genes and its implications for V-J joining mechanism
Nature 302,260-263
- 51 Hohn.B., 1979:
In vitro packaging of lambda and cosmid DNA
Methods Enzymol. 68,299-309
- 52 Hoyningen-Huene,von,V., Norbury,C., Griffith,M., M.Fried. 1986:
Gene activation properties of a mouse DNA sequence isolated by expression selection
Nucleic Acids Res. 14 (14),5615-5626
- 53 Igo-Kemenes,T., Hoerz,W., H.G.Zachau, 1982:
Chromatin
Annu. Rev. Biochem. 51,89-122
- 54 Imagawa,M.R., Chiu,R., M.Karin. 1987:
Transcription factor AP2 mediates induction by two different signal-transducing pathways: protein kinase C and cAMP
Cell 51,251-260
- 55 Ishi,S. Xu,Y., Stratton,R.H., Roe,B.A., Merlino,G.T., I.Pastan. 1985a:
Characterisation and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,4920-4924
- 56 Ishi,S., Merlino,G.T., I.Pastan. 1985b:
Promoter region of the human Harvey ras proto-oncogene: similarity to the EGF receptor proto-oncogene promoter
Science 230,1378-1380
- 57 Jones,K.A., Yamamoto,K.R., R.Tjian. 1985:
Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro
Cell 42,559-572

- 58 Jones,N.J., Rigby,P.W.J., E.B.Ziff, 1988:
Trans-acting protein factors and the regulation of
eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA
tumor viruses
Genes & Development 2,267-281
- 59 Jones,P.A., Taylor,S.M., Mohandas,T., L.J.Shapiro. 1982:
Cell-cycle specific reactivation of an inactive
X-chromosome locus by 5-azacytidin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79,1215-1219
- 60 Kato,S., Anderson,R.A., R.D.Camerini-Otero. 1986:
Foreign DNA introduced by calcium phosphate is
integrated into repetitive DNA elements of the mouse L
cell genome
Mol. Cell. Biol. 6 (5).1787-1795
- 61 Khoury,G., P.Gruss, 1983:
Enhancer elements
Cell 33,313-314
- 62 Kimura,S., Gonzalez,F.J., D.W.Nebert, 1984:
Mouse cytochrome P-450: complete cDNA and amino acid
sequence
Nucleic Acids Res. 12 (6),2917-2928
- 63 Knight,S.L., 1980:
The nucleotide sequence and transcription map of the
herpes simplex virus thymidine kinase gene
Nucleic Acids Res. 8,5949-5964
- 64 Kovedesi,I., Satake,K., Furukawa,K., Reichel,R., Ito,Y.,
J.R.Nevins, 1987:
A factor discriminating between the wildtyp and a mutant
polyoma enhancer
Nature 328,87-89
- 65 Krimpenfort,P., de Jong,R., Kematsu,Y., Dembic,Z., Ryser,S.,
Boehmer,H., Steinmetz,M., A.Berns, 1988:
Transcription of T-cell receptor beta-chain is
controlled by a downstream regulatory element
EMBO J. 7,745-750
- 66 Kruczek,I., Domrath,S., S.Garbrecht, 1988:
Ad12 E1A promoter: a control element within the ITR is
functionally replaced by hamster DNA at the integration
site of a tumor cell line
zur Veröffentlichung eingereicht
- 67 Kruczek,I., W.Doerfler, 1983:
Expression of the acetyltransferase gene in mammalian
cells under the control of adenovirus type 12 promoters:
effect of promoter methylation on gene expression
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78,943-947

- 68 Kubo,T., Fukuda,K., Mikami,A., Maeda,A., Takahashi,H.,
Mishina,M., Haga,T., Haga,K., Ichiyama,A., Kangawa,K.,
Kojima,M., Matsuo,H., Hirose,T., S.Numa, 1986:
Cloning, sequencing and expression of complementary DNA
encoding the muscarinic acetylcholine receptor
Nature 323,411-416
- 69 Laimins,L.A., Khoury,G., Gorman,C., Howard,B., P.Gruss, 1982:
Host specific activation of transcriptin by tandem
repeats from simian virus 40 and moloney murine sarcoma
virus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79,6453-6457
- 70 Leder,P., Tiemeier,D., l.Enquist, 1977:
EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the
cloning of DNA from higher organisms: The Lambda gtWES
system
Science 222,175
- 71 Lee,K.A.W., M.R.Green, 1987:
A cellular transcription factor E4F1 interacts with an
E1A-inducible enhancer and mediates constitutive
enhancer function in vitro
EMBO J. 6 (5),1345-1353
- 72 Lee,M.G.-S., Loomins,C., N.J.Cowan, 1984:
Sequence of an expressed human beta-tubulin gene
containing ten Alu family members
Nucleic Acids Res. 12 (14),5823-5836
- 73 Lehrach,H., Diamond,D., Wozney,J.M., H.Boedtker, 1977:
RNA molecular weight determinations by gel
elektrophoresis under denaturing conditions, a critical
reexamination
Biochemistry 16,4743
- 74 Lusky,M., Berg,L., Weiher,H., M.Botchan, 1983:
Bovine papillomavirus contains an activator of gene
expression at the distal end of the early transcription
unit
Mol. Cell. Biol. 3,1108-1122
- 75 Macpherson,I., M.Stoker, 1962:
Polyoma transformation of hamster cell clones - an
investigation of genetic factors affecting cell
competence
Virology 16,147-151
- 76 Maniatis,T., Fritsch,E.F., J.Sambrook, 1982:
Molecular cloning. A laboratory manual
Cold Spring Harbor, N.Y.
- 77 Maniatis,T., Hardison,R.C., Lacey,E., Laner,J.,
O'Connell,C., Quon,D., Sim,G.K., A.Efstradiatis, 1978:
The isolation of structural genes from libraries of
eukaryotic DNA
Cell 15,687-701

- 78 McMaster,G.K., G.G.Carmichael, 1977:
Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange
Proc. Natl. Acad. Sci.74,4835
- 79 Melton,D.A., Krieg,P.A., Rebagliati,M.R., Maniatis,T., Zinn,K., M.R.Green, 1984:
Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridisation probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter
Nucleic acids Res. 12 (18),7035-7040
- 80 Mercken,L., Simons,M.-J., de Martynoff,G., Swillens,S., G.Vassart, 1985:
Presence of hormonogenic and repetitive domains in the first 930 amino acids of bovine thyroglobulin as deduced from the cDNA sequence
Eur. J. Biochem. 147,59-64
- 81 Mitchell,P.J., Wang,C., R.Tjian, 1987:
Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer binding protein AP2 is inhibited by SV40 T antigen
Cell 50,847-861
- 82 Mottez,E., Rogan,P.K., L.Manuelidis, 1986:
Conservation in the 5' region of the long interspersed mouse L 1 repeat: implications of comparative sequence analysis
Nucleic Acids Res. 14 (7),3119-3136
- 83 Nevins,J.R., Imperiale,M.J., Kao,H.-T., L.T.Feldman, 1984:
Role of the adenoviral E1A product in transcriptional activation
In Oncogenes and Viral Genes, G.F. Van de Woude et al., eds. Cold Spring
- 84 Nordheim,A., A.Rich, 1983:
Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments with transcriptional enhancer sequences
Nature 303,674-678
- 85 Ondek,B., Gloss,L., W.Herr, 1988:
The SV40 enhancer contains two distinct levels of organisation
Nature,333 (5),40-45
- 86 Ou,C., Boone,L.R., W.K.Yang, 1983:
A novel sequence segment and other nucleotide structural features in the long terminal repeat of a BALB/c mouse genomic leukemia virus-related DNA clone
Nucleic Acids Res. 11 (16),5603-5720
- 87 Palmiter,D.R., R.L.Brinster, 1985:
Transgenic mice
Cell 41,343-345

- 88 Pellicier,A., Robins,D., Wold,D., Sweet,B., Jackson,I., Lowry,I., Robert,J.M., Sim,G.K., Silverstein,S., R.Axel, 1980:
Altering genotype and phenotype by DNA mediated gene transfer
Science 209,1414-1422
- 89 Piette,J., M.Yaniv, 1987:
Two different factors bind to the alpha-domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the SV40 and c-fos enhancers
EMBO J. 6 (5),1331-1337
- 90 Ptashne,M., 1986:
Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance
Nature 322,697-701
- 91 Rigby,P.J.W., Dieckman,M., Rhodes,C., P.Berg, 1977:
Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation~with DNA polymerase I
J. Mol. Biol. 98,503-515
- 92 Rio,D., Robbins,A., Myers,R., R.Tjian, 1980:
Regulation of simian virus 40 early transcription in vitro by a purified tumor antigen
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77,5706-5710
- 93 Robb,J.A., K.Huebner, 1973:
Effect of cell chromosome number on simian virus 40 replication
Exp. Cell Res. 81,120-126
- 94 Robb,J.A., K.Huebner, 1973:
Effect of cell chromosome number on simian virus 40 replication
Exp. Cell Res. 81,120-126
- 95 Schirm,S., Jiricny,J., W.Schaffner, 1987:
The SV40 enhancer can be dissected into multiple segments, each with a different cell type specificity
Genes & Development 1,65-74
- 96 Schuetz,G., 1988:
Control of gene expression by steroid hormones
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369,77-86
- 97 Serfling,E., Jasin,M., W.Schaffner, 1985:
Enhancers and eukaryotic gene transcription
Trends in Genetics 8,224-230
- 98 Shepherd,J.H., Mulvihill,E.R., Thomas,P.S., R.D.Palmiter, 1986:
Commitment of chick oviduct tubular gland cells to produce ovalbumin mRNA during hormonal withdraw and restimulation
J. Cell. Biol. 87,142-151

- 99 Southern P.J., P.Berg, 1982:
Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter
J. Mol. Appl. Genet. 1,327-341
- 100 Southern,E., 1975:
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis
J. Mol. Biol. 98,503-515
- 101 Stabel,S., W.Doerfler, 1982:
Nucleotide sequence at the site of junction between adenovirus type 12 DNA and repetitive hamster cell DNA in transformed cell line CLAC1
Nucleic Acids Res. 10,8007-8023
- 102 Stanton,L.W., K.B.Marcu, 1982:
Nucleotide sequence and properties of the murine gamma-3 immunoglobulin heavy chain gene switch region: implications for successive C-gamma gene switching
Nucleic Acids Res. 10 (19),5993-6006
- 103 Steele,P.E., Rabson,A.B., Bryan,T., M.A.Martin, 1984:
Distinctive termini characterize two families of human endogenous retroviral sequences
Science 225,943-947
- 104 Subramanian,K.N., T.Shenk, 1978:
Definition of the boundaries of the origin of DNA replication in simian virus 40
Nucleic Acids Res. 5,3635-3642
- 105 Sutter, D., Westphal,M., W.Doerfler, 1978:
Patterns of integration of viral sequences in the genomes of adenovirus type 12 transformed hamster cells
Cell 14,569-585
- 106 Terao,M., Watanabe,Y., Mishina,M., S.Numa, 1983:
Sequence requirements for transcription in vivo of the human preproenkephalin A gene
EMBO J. 2 (12),2223-2228
- 107 Thomas,K.R., Folger,K.R., M.R.Capecchi, 1986:
High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome
Cell 44,419-428
- 108 Tooze,J., 1981:
Molecular biology of tumor virus: Part2
DNA Tumor Viruses, 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
- 109 Tsujimoto,Y., C.M.Croce, 1986:
Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma
Proc. Natl. Acad.Sci. USA 83,5214-5218

- 110 Vieira,J., J.Messing, 1982:
The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers
Gene 19,259-268
- 111 Vinograd,J., Harris,J., Davidson,N., W.F.Dave, 1963:
The buoyant behaviour of viral and bacterial DNA in alkaline CsCl
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 49,12-17
- 112 Voss,S.D., Schlokot,U., P.Gruss, 1986:
The role of enhancers in the regulation of cell type specific transcriptional control
Trends in Biochemical Sciences 11,287-289
- 113 Walker,M.D., Edlund,T., Boulet,A.M., W.J.Rutter, 1983:
Cell-specific expression controlled by the 5'-flanking region of insulin and chymotrypsin genes
Nature 306,557-561
- 114 Wallace.R.B., Jokuson,M.J., Suggs,S.V., Miyoski,K., Bhatt,R., K.Itakura, 1981:
A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR 322
Gene 16,21-26
- 115 Wasylyk,B., P.Chambon, 1981:
A T to G base substitution and small deletions in the conalbumin TATA box drastically decrease specific in vitro transcription
Nucleic Acids Res. 9,1813-1824
- 116 Weber,F., deVilliers,J., W.Schaffner, 1984:
An SV40 enhancer trap incorporates exogenous enhancers and generates enhancers from its own sequence
Cell 36,983-992
- 117 Weiher,H., Koenig,M., P.Gruss, 1982:
Multiple point mutations affecting the simian virus 40 enhancer
Science 219,626-631
- 118 Weydert,A., Daubas,P., Caravatti,M., Minty,A., Bugaisky,G., Cohen,A., Robert,B., M.Buckingham 1983:
Sequential accumulation of mRNAs encoding different myosin heavy chain isoforms during skeletal muscle development in vivo detected with a recombinant plasmid identified as coding for an adult fast myosin heavy chain from mouse skeletal muscle
J. Biol. Chem. 258 (22),13867-13874
- 119 Winberg,G., M.L.Hammarskjöld, 1980:
Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper: Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA
Nucleic Acids Res. 8,253-264

- 120 Wingeder,E., 1988:
Compilation of transcription regulating proteins
Nucleic Acids Res. 16 (5),1879-1902
- 121 Wood,K.O., J.C.Lee, 1966:
Integration of synthetic globulin genes in an E. coli
plasmid
Nucleic Acids Res. 1961-1972
- 122 Xiao,J.H., Davidson,I., Ferrandon,D., Rosales,R.,
Vigneron.M., Macchi,M., Ronernach,F., P.Chambon, 1987:
One cellspecific and three ubiquitous nuclear proteins
bind in vitro to overlapping motifs in the domain B1 in
the SV40 enhancer
EMBO J. 6,3005-3013
- 123 Yoshimura,F.K., K.Chaffin, 1987:
Different activities of viral enhancer elements before
and after stable integration of transfected DNAs
Mol. Cell. Biol. 7 (3),1296-1299
- 124 Zenke,M., Grundstroem,T., Mathes,H., Winzerith,M.,
Schatz,C., Wildeman,M., P.Chambon, 1986:
Multiple sequence motifs are involved in SV40 enhancer
function
EMBO J. 5,387-397

Lebenslauf

Name: Sabine Garbrecht-Büttner
Geburtsdatum: 9.8.1956
Geburtsort: Dresden
Eltern: Kurt Garbrecht und Eva Garbrecht,
geb. Schmidt
Familienstand: verheiratet
1963-1967: Grundschule in München
1967-1976: Thomas-Mann-Gymnasium in München
1976: Abitur
1976-1977: Studium der Pädagogik, Soziologie und
Psychologie an der Ludwig-Maximilians-Universität
München
1977-1982: Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
1980: Diplomvorprüfung
1981: Gaststudent an der University of British Columbia,
Vancouver, Canada
1982: Diplomhauptprüfung
01.1983-10.1984: Diplomarbeit unter Anleitung von Prof.Dr.
F. Kaudewitz am Institut für Mikrobiologie und
Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Thema: "Cytochrom c₁-Import in Mitochondrien:
Isolierung eines bei der Reifung des Häm-Proteins
beteiligten Gens aus *Saccharomyces cerevisiae*"
01.1985-06.1988: Promotionsarbeit unter Anleitung von Prof.Dr.
E. Fanning am Institut für Biochemie der Universität
München
Thema: "Isolierung und Charakterisierung zellulärer
Transkriptionskontrollsequenzen aus dem Genom einer
Hamsterzelllinie"

